



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Influência da transferência de massa de oxigénio na acumulação de lípidos pela levedura *Rhodosporidium* *toruloides*

Fábio Guerreiro

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

27-09-2013

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Biológica

Tese orientada pela Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo e
coorientada pela Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito.
Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da
listagem de referências incluída.

Fábio Guerreiro

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“I became insane, with long intervals of horrible sanity.”

Edgar Allan Poe

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registado o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

À Professora Doutora Sara Raposo pela muita paciência que sempre teve, pelo seu apoio, ensinamentos e disponibilidade demonstrada durante a orientação desta dissertação de mestrado.

À Professora Doutora Maria Emília Costa pela partilha de conhecimentos, pelos “brainstorm” e por todo o apoio prestado.

Às minhas colegas e amigas, Engenheira Ana Constantino e Engenheira Brígida Rodrigues, pela amizade, ajuda, conhecimento transmitido, pelos bons momentos e pela redescoberta do sushi.

Em especial, aos meus pais e irmão por serem os melhores, e pela inesgotável paciência. À minha avó pelas esplendidas refeições.

À minha namorada tenho também um agradecimento especial, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, incentivos e pelos conhecimentos de formatação.

RESUMO

A produção e acumulação de lípidos pela levedura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* CECT 1499 é altamente condicionada pela transferência de massa de oxigénio. A eficiência da transferência de oxigénio pode ser aumentada pela adição de vetores de oxigénio, do incremento do arejamento e agitação ou através da alteração da geometria do reator.

Os resultados obtidos revelam que o *n*-dodecano tem um o impacto positivo na acumulação de lípidos pela *R.toruloides*, alcançando 0,6194 g lípidos/g biomassa e um conteúdo lipídico de 1,042 g/L, na presença de 1% *n*-dodecano. A otimização da geometria do dispersor e arejamento promove uma maior quantidade de oxigénio disponível para as células o que se verificou num aumento considerável na taxa específica de crescimento 0,0845 h⁻¹ e um conteúdo em lípidos de 0,6091 g lípidos/g biomassa. Com o objetivo de melhorar a taxa de transferência de oxigénio promovendo a produção lipídica, juntaram-se as duas abordagens anteriormente referidas, obtendo-se um rendimento lipídico de 0.7301 g lípidos/g biomassa e uma concentração de 1,634 g/L.

O controlo de pH em torno dos 5,5 reduziu para aproximadamente um terço o tempo de obtenção de lípidos máximos, com 2,232 g/L de lípidos e consequentemente um aumento de produtividade 0,05296 g/L.h. No entanto, não apresentou diferenças significativas no conteúdo lipídico, 0,755 g lípidos/g biomassa.

Os resultados obtidos permitiram-nos afirmar que o crescimento celular da levedura, assim como, a acumulação de lípidos intracelulares é extremamente influenciada pela disponibilidade e transferência de oxigénio para a célula. Estas questões podem ser favorecidas por estratégias que aumentem a transferência de massa de oxigénio, como sendo a adição de agentes com maior solubilidade, vetores de oxigénio e a otimização da geometria do dispersor associada a uma maior taxa de arejamento. Um ambiente com o pH controlado, próximo do pH fisiológico da célula, proporciona melhores condições de crescimento, porém não afeta a capacidade de acumulação lipídica desta levedura.

Palavras-chave: *Rhodospiridium toruloides*, *n*-dodecano, leveduras oleaginosas, transferência de massa de oxigénio, biodiesel, vetor de oxigénio.

ABSTRACT

Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* CECT 1499 is highly conditioned by the oxygen mass transfer. The oxygen transfer efficiency can be increased by addition of oxygen vector, increment of aeration and agitation or by the geometry of the reactor.

Bioreactor batch cultures demonstrated that *n*-dodecane has a positive effect on the lipids accumulation by the yeast *R. toruloides*, with a lipid content of 0,6195 g lipids/g biomass, in the presence of 1 % *n*-dodecane. The optimization of the aeration conditions and sparger geometry increases the available quantity of oxygen to the cells which resulted in an increase of the specific growth rate 0,0845 h⁻¹ and lipid content 0,6091 g lipids/g biomass. With the purpose of improve the oxygen transfer rate have joined the two approaches sparger geometry and addition of 1% *n*-dodecane, resulting in obtaining a lipidic yield content of 0,7301 g lipids/g biomass and a lipid concentration of 1,634 g/L.

pH control around 5.5, reduced the culture time to obtain maximum lipids for approximately one third, with 2,232 g/L of lipids and consequently an increase in productivity, 0,05296 g/L.h. However, the pH control showed no significant differences in lipid content in the culture.

The results obtained have allowed to affirm that the yeast growth and lipids accumulation are extremely influenced by the availability and transfer of oxygen to the cell. These questions may be favored by strategies that increase the oxygen mass transfer, as the addition of agents with greater solubility, oxygen vectors, and optimization of the sparger geometry associated with a higher aeration rate. An environment with controlled pH provides better growing conditions, but does not affect the ability of lipid accumulation by this yeast.

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*, *n*-dodecane, oleaginous yeast, Oxygen mass transfer, biodiesel, oxygen vector

Lista de abreviações

ACL	ATP-citrato liase
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIMA	Centro de Investigação Marinha e Ambiental
C/N	Rácio de carbono azoto
CoA	Coenzima A
C/P	Rácio carbono fósforo
C/S	Rácio de carbono enxofre
DAG	Diglicérido
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
FAME	Éster metílico de ácido gordo
FAS	Ácido gordo sintase
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência
K _L a	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio
LEBA	Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OTR	Taxa de transferência de oxigénio
OUR	Taxa de consumo de oxigénio
PBS	Tampão fosfato
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PtdOH	Ácido fosfatídico
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
rpm	Rotações por minuto
STR	Reator mecanicamente agitado
TAG	Triglicérido
UF	Unidades de fluorescência
vvm	Volume de gás por volume útil no reator biológico por minuto

$X_{\text{máx}}$	Concentração máxíma de biomassa
$Y_{L/S}$	Rendimento de lípidos em relação ao substrato
$Y_{L/x}$	Rendimento de lípidos em relação à biomassa
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
$Y_{x/S}$	Rendimento de biomassa relativamente ao substrato
μ_{max}	Taxa específica de crescimento

ÍNDICE

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
Índice de figuras	XIX
Índice de tabelas	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Análise económica da produção de biodiesel	2
1.3 Processo geral de produção de biodiesel	2
1.4 Microrganismos oleaginosos	4
1.5 Levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i>	5
1.6 Acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos	5
1.6.1 Síntese de ácidos gordos	8
1.6.2 Síntese de triglicéridos	9
1.7 Fatores influentes na acumulação Lipídica	11
1.7.1 Importância do oxigénio	11
1.8 Reatores biológicos	12
1.8.1 Transferência de massa de oxigénio	13
1.8.2 Transferência de oxigénio num processo microbiano	16
1.8.3 Vetores de oxigénio	18
1.9 Objetivo	19
2. Materiais e Métodos	21
2.1 Estirpes de leveduras, meios e condições de conservação e de cultura	21
2.1.1 Leveduras	21
2.1.2 Conservação de leveduras	21
2.1.3 Meios de Cultura	21

2.2	Condições de crescimento celular.....	22
2.2.1	Preparação de inóculos e pré-inóculos	22
2.2.2	Crescimento em Reator Biológico.....	22
2.3	Ensaio Experimentais	23
2.3.1.	Determinação da capacidade de transferência de massa de oxigênio em reator biológico.....	23
2.3.1.1.	Efeito da geometria do dispersor.....	23
2.3.1.2.	Efeito do arejamento	24
2.3.2.	Ensaio de crescimento celular e acumulação lipídica.....	24
2.3.2.1.	Influência da utilização de <i>n</i> -dodecano como vetor de oxigênio	24
2.3.2.2.	Otimização da geometria do dispersor e arejamento	24
2.3.2.3.	Influência do controle de pH.....	25
2.4	Métodos analíticos	25
2.4.1	Peso seco	25
2.4.2	Densidade ótica.....	25
2.4.3	Quantificação dos açúcares	26
2.4.4	Quantificação de azoto	26
2.4.5	Quantificação de lípidos por fluorescência	27
2.4.6	Extração de lípidos pelo método de Folch.....	28
2.4.7	Análise do perfil de ácidos gordos	29
2.5	Caracterização da cinética de crescimento	29
2.5.1	Taxa específica de crescimento	29
2.5.2	Tempo de duplicação celular	30
2.5.3	Cálculos de rendimentos.....	30
2.5.3.1.	Rendimento de biomassa em função do substrato	30
2.5.3.2.	Rendimento lípidos em função de substrato	30
2.5.3.1.	Rendimento de lípidos em função de biomassa	30

2.5.4	Produtividade máxima de lípidos	31
2.5.1	Determinação do K_{La}	31
3.	Resultados e Discussão	33
3.1	Curva padrão de trioleína.....	33
3.2	Determinação da capacidade de transferência de massa de oxigénio em reator biológico	34
3.2.1.	Efeito da geometria e número de dispersor na capacidade de transferência de massa de oxigénio.....	35
3.2.2.	Influência do arejamento na capacidade de transferência de massa de oxigénio.	36
3.3	Crescimento da levedura <i>Rhodospiridium toruloides</i> em reator agitado mecanicamente	37
3.3.1	Influência do vetor <i>n</i> -dodecano no crescimento e acumulação lipídica... 37	
3.3.2	Otimização da geometria e número de dispersor e arejamento na acumulação lipídica	41
3.3.3	Efeito do vetor de oxigénio e da geometria e número de dispersor no crescimento e acumulação lipídica	44
3.3.4	Influência do controlo de pH na acumulação lipídica	47
3.4	Análise do perfil de ácidos gordos.....	50
4.	Conclusão	53
5.	Perspetivas futuras	55
	Bibliografia.....	57
	Anexos.....	65
I.	Preparação da infusão de Batata	65
II.	Preparação do tampão fosfato salino (PBS)	65
III.	Método de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico)	65
IV.	Curva de calibração dos açúcares redutores	66
V.	Curva de calibração do azoto.....	67

VI.	Curvas de calibração dos ácidos gordos	67
-----	--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da transesterificação de triglicérido com álcool. (Adaptado de Ma & Hanna, 1999 ¹⁸).....	3
Figura 2. Representação esquemática da transesterificação de triglicéridos com metanol para produzir FAME. (Adaptado de Zhang <i>et al.</i> , 2003 ¹¹).....	3
Figura 3. Diagrama representativo de como o ciclo citrato/malato e o ciclo citosólico “transhidrogenase” (Adaptado de Ratledge, 2004 ³⁸).....	7
Figura 4. Via das pentoses de fosfato. (Adaptado de Campbell & Farrel 2011 ¹⁴).....	8
Figura 5. Síntese de PUFA, a partir de acetil-CoA e malonil-CoA. (Adaptado de Rossi <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁶ e Campbell & Farrel 2011 ¹⁴)	9
Figura 6. Vias de formação de triglicéridos. (Adaptado de Czabany <i>et al.</i> , 2007 ⁴⁷).....	10
Figura 7. Fenómeno de transferência de massa, transporte de oxigénio da fase gasosa para o interior das células em reator biológico.....	14
Figura 8. Gradientes de concentração para a transferência de massa gás-líquido. (Adaptado de Doran, 1995 ⁸¹).....	15
Figura 9. Mecanismo possível para a transferência de oxigénio na presença de vetores de oxigénio. (Adaptado de Rol set <i>al.</i> , 1990 ⁷⁷)	18
Figura 10. Curva padrão de trioleína.....	34
Figura 11. Perfil de crescimento e de acumulação lipídica da levedura <i>Rhodospiridium toruloides</i> CECT 1499. (A) sem <i>n</i> -dodecano, (B) 1% de <i>n</i> -dodecano e (C) 2% de <i>n</i> -dodecano. Reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0.5 vvm através de um dispersor poroso.....	38
Figura 12. Perfil de crescimento e de acumulação lipídica da levedura <i>Rhodospiridium toruloides</i> CECT 1499. (A) sem <i>n</i> -dodecano e (B) 1% de <i>n</i> -dodecano Reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0.75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo.....	42
Figura 13. Perfil de crescimento e de acumulação lipídica da levedura <i>Rhodospiridium toruloides</i> CECT 1499, com controlo de pH e na presença de 1% de <i>n</i> -dodecano. Reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0.75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico com diferentes dispersores em reator biológico STR 2 L, 1,5 L de volume útil, a uma temperatura de 30 ± 1 °C, arejamento de 0,5 <i>vvm</i> , agitação de 200 rpm com uma turbina de Rushton	35
Tabela 2. Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico com diferentes caudais de arejamentos e diferentes dispersões de <i>n</i> -dodecano em reator biológico STR 2 L (1,5 L de volume útil), a uma temperatura de 30 ± 1 °C, agitação de 200 rpm com uma turbina de Rushton e arejamento efetuado através de dois dispersores porosos em conjunto.	36
Tabela 3. Parâmetros de crescimento da levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> CECT 1499, com diferentes concentrações de <i>n</i> -dodecano, em reator biológico STR 2L , a 30 °C, 200 rpm e 0,5 <i>vvm</i> através de um dispersor poroso.....	39
Tabela 4. Parâmetros de crescimento da levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> CECT 1499, com diferentes geometrias de dispersor em reator biológico STR 2 L, a 30 °C e 200 rpm.....	42
Tabela 5. Parâmetros de crescimento da levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> CECT 1499, com diferentes geometrias de dispersor na presença de diferentes concentrações de <i>n</i> -dodecano em reator biológico STR 2 L, a 30 °C e 200 rpm.....	45
Tabela 6. Parâmetros de crescimento da levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> CECT 1499, com e sem controlo de pH com adição de 1% <i>n</i> -dodecano, em reator biológico STR 2L , a 30 °C, 200 rpm e 0,75 <i>vvm</i> através de dois dispersores porosos em simultâneo.....	48
Tabela 7. Perfil de ácidos gordos da levedura <i>R.toruloides</i> CECT 1499 no final dos crescimentos celulares em comparação com o perfil de ácidos gordos que constituem outros óleos e outras estirpes.	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

A economia global, regida pelo petróleo, está instável. O aumento do preço do petróleo, as preocupações ambientais, o esgotamento dos recursos fósseis, a crescente instabilidade geopolítica dos países com reservas de petróleo, são fatores que impulsionaram a procura de novas fontes de energia, nomeadamente renováveis^{1,2}.

No presente 2013, o Governo português decretou em Diário da República o Decreto-Lei n.º 39/2013 de 18 de março, onde é definida, para 2020, *a utilização de energia proveniente de fontes renováveis no consumo energético de todos os modos de transporte em 10% do consumo total de energia nos transportes*. Para 2020 está previsto um consumo de 860 mil toneladas de biocombustíveis em Portugal, sendo que atualmente são produzidos aproximadamente 500 mil toneladas de biocombustíveis. Face ao que antecede, o aumento da produção e/ou importação de biocombustíveis é inevitável, para que as metas, impostas pela Comissão Europeia e Governo português, sejam cumpridas. Contudo a maioria da matéria-prima utilizada na produção de biocombustíveis, nomeadamente biodiesel, é importada e de origem vegetal^{3,4}.

Segundo a definição do Decreto-Lei n.º 39/2013 de 18 de março, biocombustíveis *são os combustíveis líquidos ou gasosos para os transportes, produzidos a partir de biomassa*. Sendo a biomassa *a fração biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura, incluindo substâncias de origem vegetal e animal, da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos*.

Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de matérias vegetais, oriundas da agricultura. Porém, existem alguns inconvenientes com a produção destes biocombustíveis, nomeadamente na possível competição por produtos agrícolas e agroindustriais, provocando um impacto negativo a nível social e ambiental. Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos através de diversas fontes de resíduos e de alguns produtos de baixo valor acrescentado. Este tipo de biocombustível apresenta-se como alternativa, uma vez que apresentam vantagens ao nível de aproveitamento dos excedentes industriais, evitando assim a competição pela terra arável para a produção de bens alimentares⁵⁻⁷.

1.2 Análise económica da produção de biodiesel

A nível nacional, a produção de biodiesel começou em 2005, com uma produção de mil toneladas por ano e atualmente são produzidos 500 mil toneladas por ano. Porém, na União Europeia são produzidos 23,5 milhões de toneladas por ano, com um custo de 1,15 €/L, 1,06 €/L e 0,98 €/L para biodiesel produzido a partir de colza, soja e palma, respetivamente^{3,4}.

O gasóleo convencional, livre de impostos, tem um custo médio de 1,16 €/L na União Europeia, em Portugal o custo é de 1,19 €/L⁸. Existe uma pequena diferença de preços entre o gasóleo convencional e o biodiesel, contudo o biodiesel conferem independência petrolífera e diminui as emissões de monóxido de carbono contribuindo menos para o aquecimento global^{9,10}.

1.3 Processo geral de produção de biodiesel

De acordo com a *American Society for Testing and Materials* (ASTM) o biodiesel são ésteres alquila de ácidos gordos derivados de matéria lipídica renovável, como óleo vegetal ou gordura animal. “Bio” refere-se à substância biológica e renovável, contrariamente ao gasóleo que é derivado do petróleo. “Diesel” é proveniente da sua utilização em motores de ignição por compressão. O biodiesel pode ser utilizado puro ou misturado com o gasóleo convencional.¹¹

O biodiesel tem algumas vantagens comparativamente com o gasóleo convencional, nomeadamente, tem baixas emissões de monóxido de carbono, não é tóxico, menor impacto ambiental, renovável, biodegradável, mais seguro de transportar e melhor lubrificação do motor^{9,12,13}.

A maioria dos componentes dos óleos vegetais e das gorduras animais são triglicéridos (TAG), de acordo com a sua natureza química, os TAG são constituídos por ácidos gordos de três cadeias carbónicas longas que estão ligadas a uma molécula de glicerol. Estes ácidos gordos diferem consoante o comprimento da cadeia carbónica, a orientação e a posição das ligações duplas^{13,14}. Os ácidos gordo maioritariamente presentes no biodiesel são os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolénico^{15,16}.

A forma mais comum de obtenção de biodiesel é através de transesterificação, nesta reação os óleos reagem com o álcool, na presença de um catalisador, produzindo ésteres alquílicos (Figura 1). Este processo é similar à hidrólise, diferindo na utilização de um álcool em vez de água. A reação de transesterificação está representada na Figura 1^{13,17}.

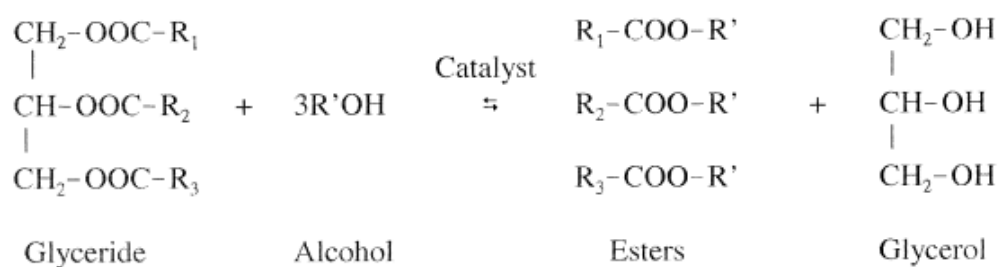


Figura 1. Representação esquemática da transesterificação de triglicérido com álcool. (Adaptado de Ma & Hanna, 1999¹⁸).

O álcool mais utilizado na transesterificação de TAG é o metanol, devido à eficiência da reação e ao seu baixo custo. Nesta reação (Figura 2), as três cadeias de ácido gordo são libertadas do glicerol e combinadas com o metanol, originando os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME, do acrónimo em inglês *Fatty Acid Methyl Ester*). Devido a esta reação ser reversível é utilizado metanol em excesso, influenciando o equilíbrio da reação no sentido da formação de produtos, ou seja, na formação de ésteres metílicos^{11,13,18}.

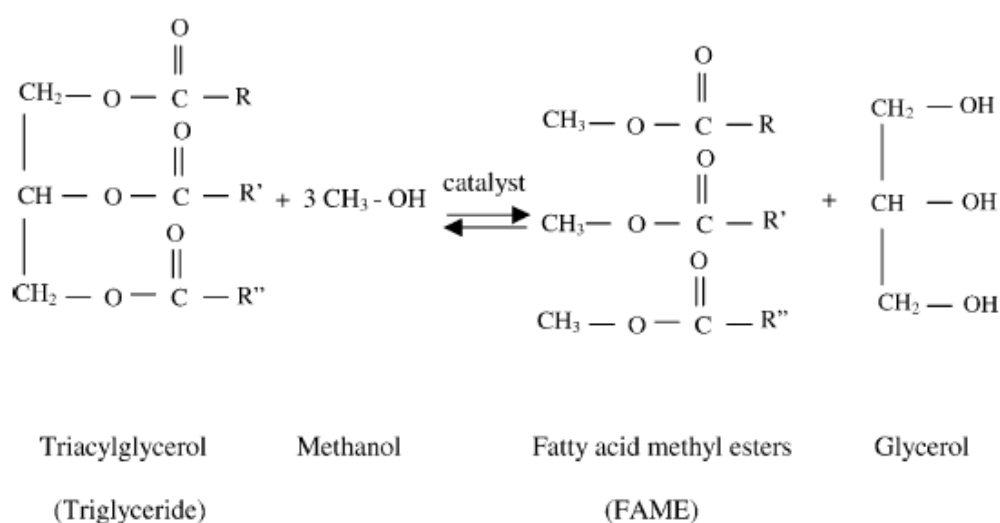


Figura 2. Representação esquemática da transesterificação de triglicéridos com metanol para produzir FAME. (Adaptado de Zhang *et al.*, 2003¹¹).

1.4 Microrganismos oleaginosos

Existem aproximadamente 600 espécies de leveduras, apenas aproximadamente 25 têm a capacidade de acumular mais de 20% da sua biomassa seca em lípidos^{16,19}. As leveduras apresentam vantagens, face a outros microrganismos. Os tempos de duplicação, normalmente, são inferiores a uma hora, as alterações climáticas e a mudança de estação não têm um impacto tão acentuado como em plantas, é mais fácil o aumento de escala, comparativamente com microalgas²⁰.

As leveduras oleaginosas com maior capacidade de acumulação de lípidos intracelulares são: *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Trichosporon pullulan* and *Yarrowia lipolytica*²⁰.

A *R. toruloides* é um basideomiceto vermelho, isolado a partir de coníferas, que acumula até 76% de lípidos com uma concentração de biomassa de 100 g/L. O perfil lipídico é 33% de ácido palmítico (C16:0) e 55% de ácido oleico (C18:1)²⁰

A *R. glutinis* tem a capacidade de acumular até 66% da sua biomassa seca em lípidos, Com a utilização de glucose como fonte de carbono a acumulação lipídica pode chegar a 72%¹⁹. Os ácidos gordos acumulados são compostos por 18% de C16:0, 60% de C18:1 e 12% de ácido linoleico (C18:2)²⁰.

O perfil lipídico da *C. curvatus* é de 28% de C16:0, 15% de ácido esteárico (C18:0) e 48% de C18:1. Esta levedura tem a capacidade de consumir glicerol como fonte de carbono, atinge 118 g/L de biomassa com uma acumulação lipídica de 69%, em meios de cultura que contêm óleos²¹.

A levedura *L. starkeyi* tem a capacidade de acumular lípidos até 73% da sua biomassa seca, utilizando como fonte de carbono a xilose, etanol e L-arabinose. Valores semelhantes aos obtidos com glucose, fonte de carbono preferencial²¹. O seu perfil de acumulação lipídico é de 33% de C16:0 e 55% de C18:1²⁰.

A *Y. lipolytica* tem a capacidade de produzir estearina²² e ácido docosahexaenóico¹⁹ (ómega 3). O seu perfil lipídico é de 11% de C16:0, 28% de C18:0 e 51% de C18:2¹⁹

1.5 Levedura *Rhodosporidium toruloides*

A levedura *Rhodosporidium toruloides* é o anamorfo da *Rhodotorula gracilis*²³. Pertence ao reino Fungi da ordem Sporidiobolales, é um microrganismo oleaginoso, estritamente aeróbio, mesófilo e não patogénico^{24–28}. Reproduz-se principalmente de forma sexuada, contudo, também se reproduz vegetativamente por gemulação ou gemulação multilateral. A morfologia da *R.toruloides* diversificar-se entre oval, redonda ou cilíndrica, podendo ser encontrada na polpa de coníferas, solo e atmosfera^{28,29}.

Como referido anteriormente, a *R.toruloides* tem a capacidade de acumular lípidos até, aproximadamente, 70% da sua biomassa seca. Um microrganismo é considerado oleaginoso quando o conteúdo mínimo de lípidos é 20% da sua biomassa seca. A forma de armazenamento dos lípidos sintetizados é na forma de TAG, em vacúolos.^{16,30,31}

A *R.toruloides* apresenta pigmentação rosa, laranja ou vermelha, consoante o meio de crescimento. Adicionalmente a *R.toruloides* sintetiza carotenoides, nomeadamente o toruleno, torularhodina e, de maior interesse, o β -caroteno. Este carotenoide é a principal fonte de provitamina A e tem efeitos antioxidantes. Outra das aplicações da levedura *R.toruloides* é a produção de fenilalanina amónio liase^{32,33}.

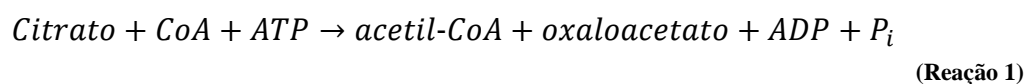
1.6 Acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos

A condição essencial para que os microrganismos oleaginosos canalizem a fonte de carbono para a síntese de lípidos é a escassez de nutrientes, como o azoto, fósforo, zinco, ferro, enxofre ou magnésio^{16,34–37}. Contudo, a estratégia mais popular para a acumulação de lípidos é a limitação de azoto^{35,38}.

Os microrganismos não oleaginosos quando crescem em meios com carência de azoto tendem a cessar a proliferação celular, se a fonte de carbono continuar a ser consumida, esta é convertida em diversos polissacarídeos. A acumulação de lípidos é muito reduzida, normalmente inferior a 10% da biomassa seca.^{38,39}

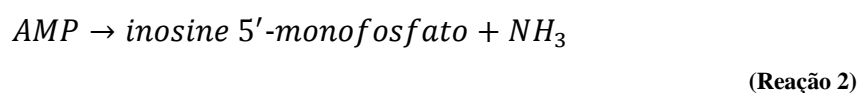
Face ao que antecede, a capacidade de acumulação de elevadas quantidades de lípidos não reside no mecanismo de biossíntese lipídica, pois este mecanismo é comum em todos os microrganismos. Essa característica é proveniente de duas condições, (i) o fornecimento contínuo de acetil-coenzima A (acetil-CoA) no citosol da célula, sendo

este um precursor da síntese de ácidos gordos, e (ii) a produção de grandes quantidades de NADPH, atuando como redutor na síntese de ácidos gordos. A formação de acetil-CoA, em microrganismos oleaginosos, é proveniente da ação da ATP-citrato liase (ACL) (Reação 1), este enzima não é sintetizado pela maioria dos microrganismos não oleaginosos.



Outro dos componentes essenciais para que a síntese de ácidos gordos ocorra de forma eficiente é a presença de ácido cítrico no citosol da célula. Este componente é sintetizado no ciclo de Krebs para a formação de acetil-CoA^{16,38,40}.

A acumulação de citrato é uma característica exclusiva dos microrganismos oleaginosos, contudo, quanto existem elevadas concentrações intercelulares de citrato a celular excreta-o para o meio extracelular^{22,41}. A acumulação de citrato é proveniente da ação do enzima isocitrato desidrogenase, que integra o ciclo de Krebs, é ativado pela presença de adenosina monofosfato (AMP). Tal dependência não é verificada em organismos não oleaginosos. A concentração de AMP é regulada pela atividade do enzima AMP deaminase (Reação 2).



Assim, em condições limitantes de azoto ocorre uma cascata de reações que culmina na formação de acetil-CoA. Quando ocorre o esgotamento de azoto, a atividade da AMP deaminase aumenta cinco vezes e há consequentemente uma diminuição dos níveis de AMP intercelular, o que leva à diminuição da atividade do enzima isocitrato desidrogenase. Consequentemente o enzima aconitase equilibra as concentrações de citrato e isocitrato, o citrato acumulado é transferido para o citosol pelo enzima citrato/malato translocase. No citosol, o enzima ACL cliva o citrato em oxaloacetato e acetil-CoA (Reação 1). Este último, é utilizado na síntese de ácidos gordos enquanto que o oxaloacetato é integrado no ciclo citrato/malato, proporcionando um fluxo continuo de citrato. Este ciclo consiste em reciclar o oxaloacetato através da ação dos

seguintes enzimas malato desidrogenase, citrato/malato translocase e citrato sintase, respectivamente. Esta sequência de eventos é representada pela Figura 3^{38,42}.

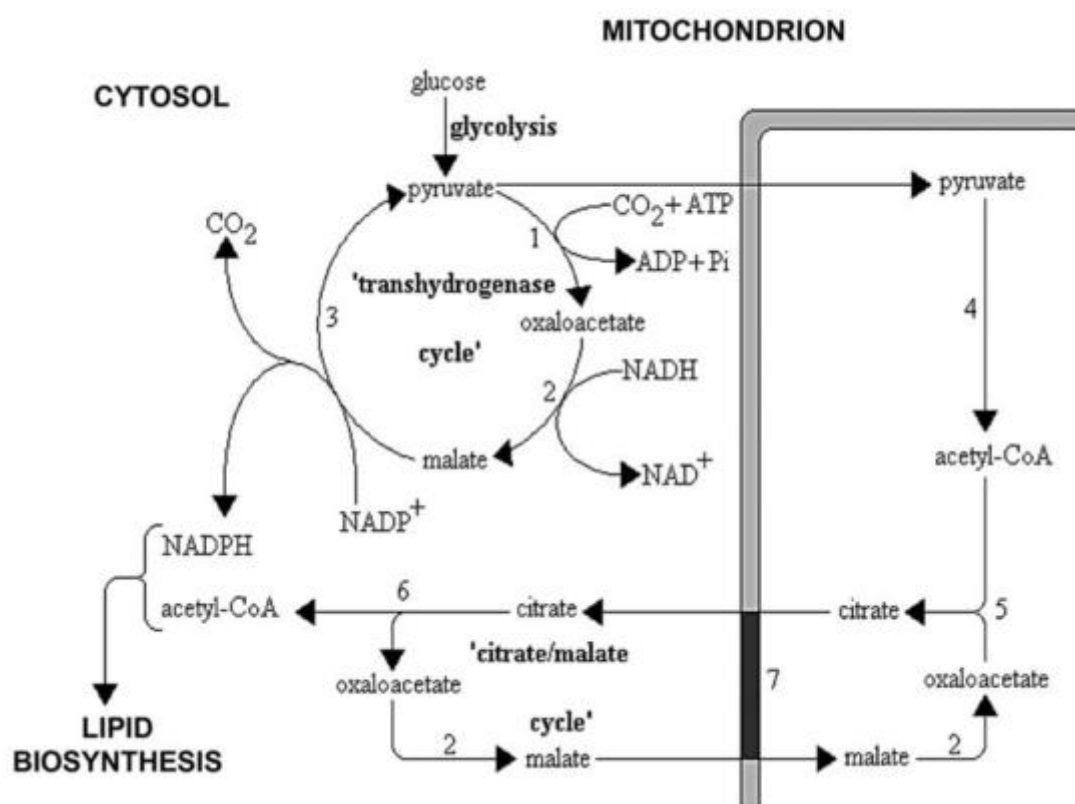
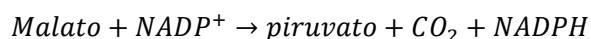


Figura 3. Diagrama representativo de como o ciclo citrato/malato e o ciclo citosólico “transhidrogenase” fornecem precursores de acetil-CoA e NADPH necessários à síntese lipídica em microrganismos oleaginosos. Enzimas: 1. piruvato descarboxilase, 2. malato desidrogenase, 3. enzima málico, 4. piruvato desidrogenase, 5. citrato sintase, 6. ATP citrato liase, 7. citrato/malato translocase. (Adaptado de Ratledge, 2004³⁸).

Embora o mecanismo demonstrado, pela Figura 3, enalteça o acetil-CoA e a dependência de AMP, do enzima isocitrato desidrogenase, outros enzimas podem ser necessários para assegurar a acumulação de lípidos. O enzima málico catalisa a reação de descarboxilação do malato a piruvato, acompanhada pela formação de NADPH, que é essencial na FAS. A síntese de 1 mol de ácido oleico requer 16 moles de NADPH^{38,43,44}.

Contudo, a origem do NADPH, para a síntese de síntese de ácidos gordos, é controversa. Segundo vários autores^{38,43-45}, a principal origem de NADPH é através da descarboxilação do malato a piruvato pelo enzima málico (Reação 3), alterações a nível deste enzima exerce modificações na acumulação e síntese lipídica.



(Reação 3)

Porém, segundo Ageitos *et al.*²¹ e Campbell & Farrel¹⁴, o NADPH é proveniente da via das pentoses de fosfato (Figura 4), existe um equilíbrio entre esta via e a glicólise, controlado pelas necessidades do microrganismo. Se o microrganismo necessitar de NADPH a via das pentoses de fosfato é ativada, caso o microrganismo necessite de ribose-5-fosfato a via é desativada.

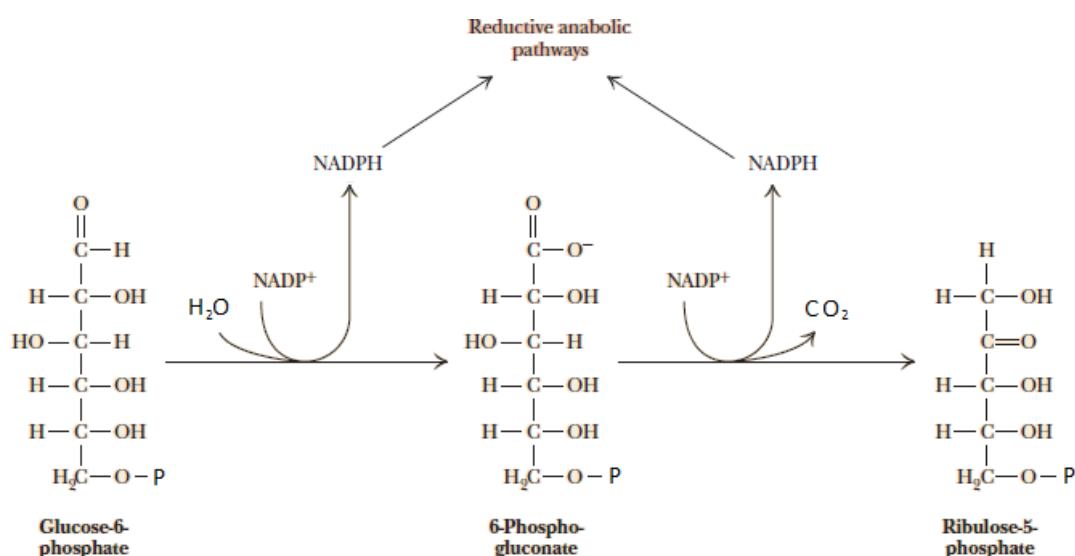


Figura 4. Via das pentoses de fosfato. (Adaptado de Campbell & Farrel 2011¹⁴)

Existem leveduras oleaginosas que não possuem o enzima málico, nomeadamente *Lipomyces* sp. e algumas *Candida* sp.³⁸. É possível que a produção de NADPH não seja proveniente de apenas uma via, mas sim da integração e cooperação entre várias vias^{16,38}.

1.6.1 Síntese de ácidos gordos

A biossíntese de ácidos gordos é realizada pelo complexo ácido gordo sintetase (FAS), a maioria dos organismos, sintetiza ácidos gordos com 16/18 carbonos. Esses ácidos gordos são modificados por consecutivas reações de desnaturação e alongamento, originando diversos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e insaturados (Figura 5).

O acetil-CoA e malonil-CoA são os compostos utilizados na síntese ácidos gordos, o malonil-CoA é proveniente da ação do enzima acetil-CoA carboxilase (Reação 4).



(Reação 4)

Em leveduras oleaginosas, a diversidade de ácidos gordos é condicionada, normalmente são sintetizados ácido oleico (18:1), linoleico (18:2), palmítico (16:0) e palmitoléico (16:1)^{16,46}.

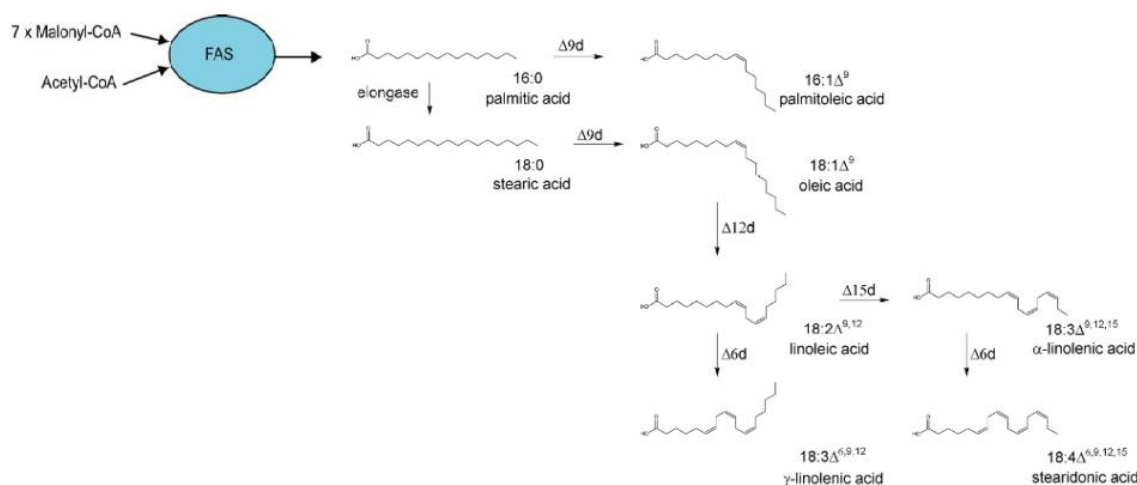


Figura 5. Síntese de PUFA, a partir de acetil-CoA e malonil-CoA. Os enzimas $\Delta 9d$, $\Delta 12d$ e $\Delta 15d$ são dessaturases presentes no retículo endoplasmático. (Adaptado de Rossi *et al.*, 2011⁴⁶ e Campbell & Farrel 2011¹⁴)

1.6.2 Síntese de triglicéridos

A maioria dos lípidos neutros presentes em leveduras são triglicéridos (TAG) e ésteres de esterol (SE), a formação de TAGs pode ser dividida em duas fases. A primeira fase consiste na formação de diacilglicerol (DAG) e a segunda fase consiste na conversão de DAG em TAG^{21,47,48}.

A síntese de DAG, em leveduras, é proveniente de duas vias, a via do glicerol-3-fosfato (G-3-P) e a via do dihidroxiacetona-fosfato (DHAP). Ambas as vias culminam na formação de ácido lisofosfatídico (1-acil-glicerol-3-fosfato, liso-PtdOH). Na primeira via, o G-3-P é acilado pela G-3-P acil-transferase originando o liso-PtdOH. O acil-CoA é produzido pelo enzima acil-CoA sintetase, que acopla os ácidos gordos com o CoA. A outra via disponível para a formação de liso-PtdOH tem como substrato o DHAP, a

primeira acilação do DHAP é também catalisada pelo enzima G-3-P acil-transferase, originando 1-acil-DHAP, que é convertido em liso-PtdOH pela ação do enzima 1-acil-DHAP reductase. Contudo esta via tem um dispêndio extra de energia, devido ao consumo de NADPH. O ácido fosfatídico (PtdOH) é resultante da ação do enzima 1-acil-G-3-P acil-transferase (segunda acilação), que tem como substrato o liso-PtdOH. Por fim a desfosforilação do PtdOH origina DAG (Figura 6), esta reação é catalisada pelo enzima fosfatase do ácido fosfatídico^{46,47,49,50}.

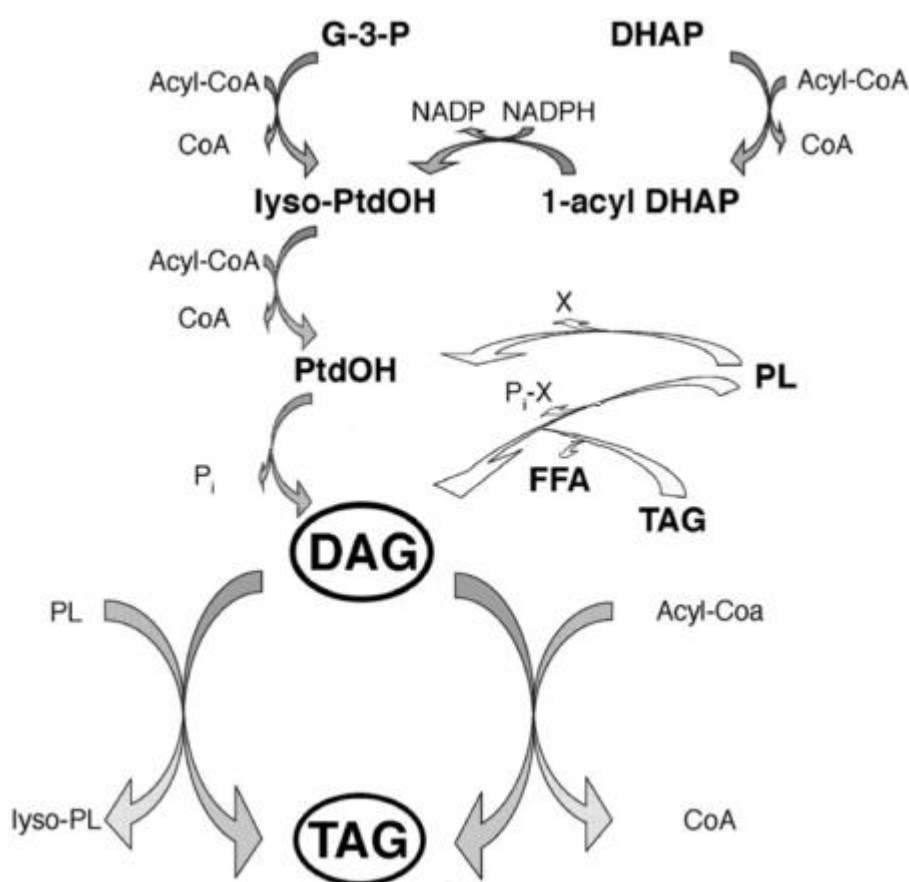


Figura 6. Vias de formação de triglicéridos. 1-acil dihidroxiacetona-fosfato: 1-acyl DHAP; diacilglicerol: DAG; dihidroxiacetona-fosfato: DHAP; ácido gordo livre: FFA; glicerol-3-fosfato: G-3-P; ácido lisofosfatídico: lyso-PtdOH; glicerofosfolipídios: PL; ácido fosfatídico: PtdOH; triglicérido: TAG; álcool: X; fosfato de álcool: P_i-X. (Adaptado de Czabany *et al.*, 2007⁴⁷)

O PtdOH também pode ser formado pela ação do enzima fosfolipase D, tendo como substrato glicerofosfolipídios (PL). Outro enzima que utiliza como substrato os glicerofosfolipídios é o fosfolipase C, esta reação tem como produto DAG⁴⁸⁻⁵⁰.

O último passo na formação de TAG é a acilação dos DAG, existem dois tipos de vias possíveis, caracterizadas pela dependência ou independência de acil-CoA. A via independente, de acil-CoA, necessita de PL, como dador do grupo acilo. O enzima

responsáveis pela transferência do grupo acilo dos LP para o DAG, formando assim os TAG, é a acil-transferase (esterificação do diacilglicerol), homólogo da lecitina colesterol acil-transferase humana^{46,47,51}.

A via dependente, de acil-CoA, os enzimas diacilglicerol acil-transferase transferem diretamente o grupo acilo do acil-CoA para o DAG, formando assim os TAG^{46,50} (Figura 6).

1.7 Fatores influentes na acumulação Lipídica

A acumulação de lípidos depende principalmente da limitação de nutrientes, fisiologia do microrganismo, pH, oxigênio presente, temperatura e dos metabolitos secundários, como o citrato¹⁹.

O fator mais manipulado na acumulação é a limitação de nutrientes, nomeadamente a carência de azoto^{35,38}, contudo, existem outros nutrientes que provocam o mesmo efeito, como referido no capítulo anterior (1.6). Segundo Zhao *et al.*⁵², em estudo desenvolvidos com a *R. toruloides* Y4, verificou que com o rácio de carbono azoto (C/N) de 70 é suficiente para haver acumulação de lípidos. São normalmente utilizados rácios C/N entre 65 e 140^{21,53–58}.

Outro dos nutrientes utilizados é o enxofre, segundo Wu *et al.*³⁶, com a *R. toruloides* Y4 observou que o rácio de carbono enxofre (C/S) de 5330 assegura a acumulação lipídica, contudo o rácio C/S de 46750 foi o que apresentou melhores resultados. O mesmo autor³⁷, noutro trabalho com a mesma estirpe, afirma que a carência de fósforo também desencadeia a acumulação de lípidos, o rácio carbono fósforo (C/P) de 9552 alcançou melhores resultados, porém, o rácio C/P de 2045 é o mínimo para que a fonte de carbono seja canalizada para a acumulação.

O pH ótimo para a acumulação lipídica varia consoante o microrganismo oleaginoso, para leveduras oleaginosas o intervalo de pH está entre 4 e 7⁵⁹, nomeadamente para a *R. toruloides* o intervalo de pH mais utilizado é entre 5,5 e 6^{36,37,52,54,60–63}, valores próximos do pH fisiológico da maioria das estirpes oleaginosas. Sendo a *R. toruloides* um microrganismo mesotrófico, prefere temperaturas moderadas, a temperatura mais utilizada na acumulação de lípidos é 30°C^{36,37,52,54,60–63}.

1.7.1 Importância do oxigénio

O oxigénio é o substrato chave em microrganismos aeróbios, estes microrganismos utilizam o oxigénio nas suas vias metabólicas catalisadas por oxidases, oxigenases e hidrólases e também na eficiente produção de energia através da cadeia transportadora de eletrões, que ocorre na mitocôndria¹⁴.

O oxigénio é de elevada importância na síntese de lípidos, como referenciado no capítulo 1.6 são necessárias grandes quantidades de energia sendo a maioria dessa energia proveniente da respiração celular^{14,38,64–66}.

O oxigénio também é substrato na produção de vários compostos, nomeadamente em reações de oxidação, como por exemplo, na produção de ácido cítrico a partir de glucose. Nesta reação são consumidas três moles de oxigénio molecular na formação de duas moles de ácido cítrico^{67–69}.

Contudo, Bati *et al.*⁷⁰ e Yen & Zhang⁷¹ defendem que em baixas concentrações de oxigénio dissolvido a acumulação lipídica é favorecida.

1.8 Reatores biológicos

Os reatores biológicos são equipamentos que permitem a monitorização de processos biológicos e/ou bioquímicos, em condições de operação controladas (pH, temperatura, pressão, arejamento, etc.). A grande vantagem na utilização de reatores biológicos é a elevada reprodutibilidade, controlo, autonomia dos ensaios, eficiência na mistura e homogeneização das suspensões celulares e maior eficácia na oxigenação do meio de cultura. Devido a estes parâmetros os reatores são utilizados em processos fermentativos, produção de biomassa, tratamento de águas residuais, processamento de alimentos e na produção de fármacos.^{72,73}

Existem vários tipos de reator biológico, leito fixo leito fluidizado, *air-lift*, coluna de bolhas e tanque mecanicamente agitado. Este último é amplamente utilizado em produções biotecnológicas a partir de culturas microbianas. Nestas produções são utilizadas diferentes geometrias de vaso, agitações e dispersores de ar.

O crescimento celular é fortemente afetado pelos parâmetros operacionais, nomeadamente arejamento e velocidade de agitação, a manipulação destas variáveis é fundamental para a obtenção do produto desejado^{72,74,75}.

Os dispersores normalmente utilizados em fermentações e crescimentos celulares são os dispersores poroso e em “L”. O dispersor em “L” tem orifícios na base e o poroso é composto por um crivo de poliuretano ou metal com pequenas perfurações de vários tamanhos de acordo com a dimensão das microbolhas.

Os agitadores mais utilizados são as turbinas de Rushton e agitadores em hélice. Estes últimos promovem um movimento axial do fluido, não são apropriados para meios com uma elevada viscosidade. As turbinas de Rushton são agitadores radiais, são normalmente utilizadas para meios de cultura que necessitam de elevadas dispersões de gás.⁷²

1.8.1 Transferência de massa de oxigénio

A concentração de oxigénio dissolvido nos meios de cultura é um fator decisivo no crescimento de microrganismos aeróbios, sendo normalmente a transferência de oxigénio o grande condicionante do sucesso dos bioprocessos^{76,77}.

A limitação surge quando o consumo de oxigénio excede o seu fornecimento, originando uma diminuição do oxigénio dissolvido no meio inferior à concentração crítica necessária ao metabolismo do microrganismo⁷⁸⁻⁸⁰.

A transferência de massa de oxigénio em reatores biológicos é maioritariamente uma transferência de massa gás-liquido, entre a bolha gasosa e a fase líquida do meio de cultivo. A velocidade de transferência do gás depende de vários fatores, nomeadamente a área interfacial de contacto (área de contacto por unidade de volume), distribuição das duas fases (gás e meio) no reator, temperatura e pressão^{73,79}.

A transferência de massa de oxigénio do meio gasoso para o interior da célula é um processo complexo, as moléculas de oxigénio devem atravessar um conjunto de resistências até serem consumidas pelas células⁷⁹.

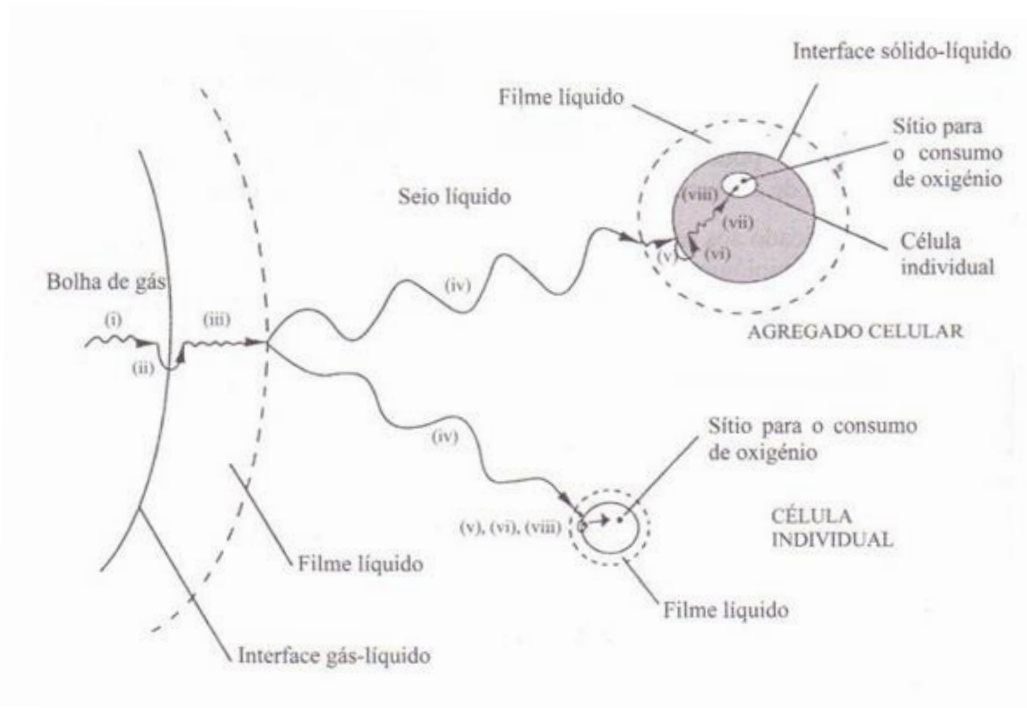


Figura 7. Fenômeno de transferência de massa que ocorre durante o transporte de oxigênio da fase gasosa para o interior das células em reator biológico. (i), transferência de massa da bolha para a interface gás-líquido; (ii), transporte através da interface gás-líquido; (iii), difusão através do filme estagnante que envolve a bolha; (iv), transporte através do líquido; (v), difusão através do filme de líquido estagnante que envolve a célula; (vi), movimento através da interface líquido-célula; (vii), difusão através do sólido até à célula individual; (viii), transporte através do citoplasma para o local da reação. (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2007⁷⁹)

Estas resistências não são todas da mesma ordem de grandeza, sendo necessário intervir nas que apresentam maior resistência no fornecimento de oxigênio às culturas microbianas. Na maioria das situações é possível afirmar que o filme líquido que envolve a bolha é a principal resistência à transferência de oxigênio. Se o meio fermentativo for viscoso é necessário contabilizar a resistência ao transporte de oxigênio. Em agregados celulares existem duas resistências de grande importância, particularmente a resistência interna à transferência de massa no filme líquido e também a resistência no filme líquido em torno do agregado^{77,79} (Figura 7).

Como referido anteriormente, a transferência de massa gás-líquido constitui uma das etapas de maior relevância no conjunto dos fenômenos de transferência de massa. Existe uma força motriz associada a cada fluido de ambos os lados de uma interface, essa força pode ser exposta em termos de gradientes de concentração na vizinhança da interface. Estes gradientes dependem da hidrodinâmica dos fluidos assim como do processo de transferência (Figura 8)^{79,81}.

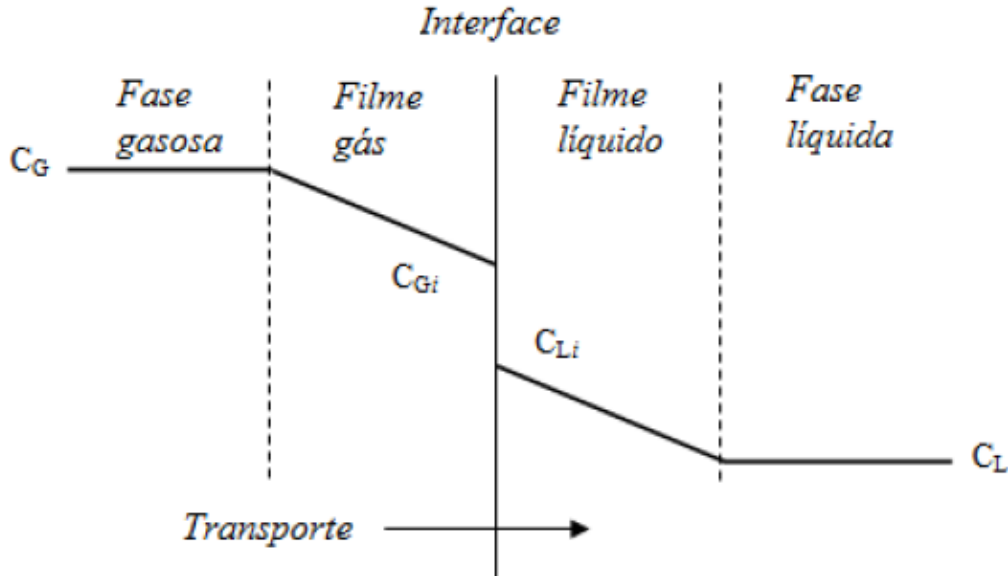


Figura 8. Gradientes de concentração para a transferência de massa gás-líquido. (Adaptado de Doran, 1995⁸¹)

No presente caso, o mecanismo de transferência de massa é descrito pela lei de Fick (Equação 1).

$$J_c = -D_c \frac{dC_c}{dz}$$

(Equação 1)

Onde J_c é o fluxo molar do componente c , D_c é o coeficiente de difusão molecular do componente c e $\frac{dC_c}{dz}$ é o gradiente de concentração através da espessura (z), do filme, representando a força motriz do sistema.

Em estado estacionário o fluxo J_c de uma substância, c toma a forma da (Equação 1).

$$J_c = k_G(C_{G,c} - C_{Gi,c}) = k_L(C_{L,c} - C_{Li,c})$$

(Equação 2)

Onde k_G e k_L são os coeficientes individuais de transferência de massa no filme de gás e de líquido, $C_{G,c}$ e $C_{L,c}$ são as concentrações do componente c na bolha de gás e no seio do líquido, respetivamente, e $C_{Gi,c}$ e $C_{Li,c}$ são as concentrações na interface.

A (Equação 3) representa o caudal molar por unidade de volume de líquido (Q_c), onde $a = A/V$ é a área específica para a transferência de massa ou área interfacial por unidade de volume de líquido (V)^{79,81,82}.

$$Q_c = J_c a = k_G a (C_{G,c} - C_{Gi,c}) = k_L a (C_{L,c} - C_{Li,c})$$

(Equação 3)

A (Equação 3) pode ser rearranjada de forma a incluir as concentrações na interface, contudo estas não são, normalmente, conhecidas pelo que se recorre ao uso de um coeficiente global de transferência de massa K_L e a uma força motriz global (Equação 4), onde $C_{G,c}^*$ é a concentração de equilíbrio de c na fase gasosa.

$$Q_c = K_L a (C_{G,c}^* - C_{L,c})$$

(Equação 4)

A relação para os coeficientes de transferência de massa (Equação 5) é obtida através da conjugação das equações 3 e 4 com a lei de Henry, que relaciona o coeficiente global de transferência de massa na fase líquida com os coeficientes individuais, tanto na fase gasosa como na fase líquida.

$$1/K_L = 1/k_L + 1/Hk_G$$

(Equação 5)

Na situação de gases pouco solúveis em água, como o oxigénio e dióxido de carbono, H é elevado e k_G é muito superior a k_L , pelo que $K_L \simeq k_L$, assim é possível admitir que a principal resistência à transferência é encontrada no filme de líquido e o respetivo coeficiente é aproximadamente igual ao coeficiente global de transferência.

Devido às dificuldades experimentais na determinação de K_L e a individualmente, é normalmente utilizado o produto $K_L a$ para caracterizar a transferência de massa gás-líquido. O $K_L a$ é designado de coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio^{79,81-83}.

1.8.2 Transferência de oxigénio num processo microbiano

A taxa de transferência de oxigénio (OTR) é um dos parâmetros condicionantes nos processos que envolvem a cultura de microrganismos e acumulação de produtos. A OTR é descrita pela (Equação 6).

$$OTR = K_L a (C^* - C)$$

(Equação 6)

$$OTR_{m\acute{a}x} = K_L a \cdot C^*$$

(Equação 7)

Onde C^* é a concentração de saturação do oxigénio dissolvido e C é a concentração de oxigénio dissolvido no líquido. A taxa de transferência de oxigénio máxima é descrita pela (Equação 7)^{73,78,82,84}.

Genericamente, a variação da concentração do oxigénio dissolvido é descrita pela equação de balanço de massa á fase gasosa (Equação 8).

$$\frac{dO}{dt} = OTR - OUR$$

(Equação 8)

Onde O é a concentração de oxigénio dissolvido no reator, t é o tempo, OTR é taxa de transferência de oxigénio e OUR é a taxa de consumo de oxigénio. A taxa de consumo de oxigénio é representada pela (Equação 9)^{79,82}.

$$OUR = q_{O_2} \cdot X$$

(Equação 9)

Como já referido anteriormente, a uma concentração celular critica, o oxigénio deixa de ser fornecido ao meio de forma suficientemente rápida, isto é se o resultado da equação 7 for negativo, o crescimento celular é limitado pela escassez de oxigénio⁷⁸⁻⁸⁰.

Face ao que antecede, foram propostas algumas soluções para aumentar as taxas de transferência de oxigénio da fase gasosa para o meio líquido, nomeadamente diferentes geometrias do reator biológico, velocidades de agitação, taxas de arejamento, diferentes tipos de dispersores ou a utilização de ar enriquecido com oxigénio

puro^{72,77,80,85}. Uma das alternativas possíveis é a adição de hidrocarbonetos insolúveis em água^{77,86}.

1.8.3 Vetores de oxigénio

A adição de uma fase orgânica (vetor de oxigénio) pode aumentar a taxa de transferência de oxigénio da fase gasosa para o microrganismo, sem a necessidade de um gasto energético^{68,87}. A adição de vetores de oxigénio é uma abordagem que consiste na adição de um composto, onde o oxigénio tem uma alta solubilidade, ao meio de cultura^{68,77,86,88}.

Os compostos mais utilizados como vetores de oxigénio são hidrocarbonetos (*n*-dodecano, *n*-hexadecano, *n*-hexano, *n*-heptano)^{74,77,78,86,88-91}, perfluorcarbonos (perfluorodecalina, brometo perfluorooctilo)^{80,92-94} e óleos de silicone de baixa viscosidade⁹⁵.

A adição de vetores de oxigénio no meio de cultura forma quatro fases no reator biológico, uma fase gasosa, aquosa, orgânica e sólida (biomassa). Existem cinco vias possíveis para a transferência de oxigénio da fase gasosa para a fase sólida⁷⁷ (Figura 9).

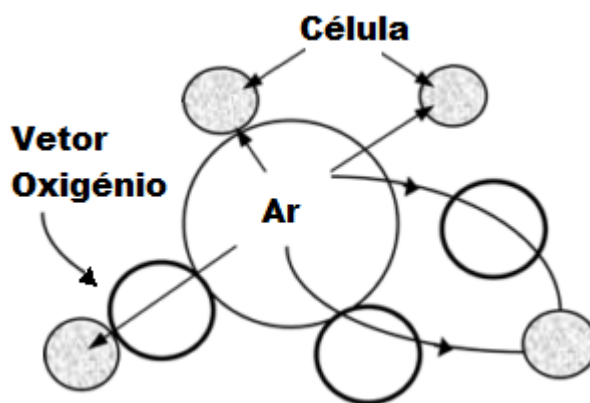


Figura 9. Mecanismo possível para a transferência de oxigénio na presença de vetores de oxigénio. (Adaptado de Rol set *al.*, 1990⁷⁷)

A transferência de oxigénio, na ausência de vetor de oxigénio, pode ser efetuada diretamente da bolha de ar (fase gasosa) para as células (fase sólida) ou então numa sequência de eventos, o oxigénio é transferido da bolha de ar para o meio de cultura (fase aquosa) e posteriormente do meio para as células. Na presença de vetores de oxigénio existem mais três vias para a transferência de oxigénio da fase gasosa para a sólida, sendo elas: da bolha de ar para as células através do vetor de oxigénio, estando

este adsorvido (i) ou não (ii) na superfície da bolha de ar, a outra via possível é o vetor de oxigénio estar adsorvido na bolha de ar e a célula estar adsorvida no vetor de oxigénio (iii). É de salientar, quando as fases não estão adsorvidas o meio de cultura é o intermediário da transferência de oxigénio^{77,83}. O mecanismo mais plausível é o que refere a adsorção do vetor de oxigénio na superfície da bolha de ar, primeiramente ocorre a transferência de oxigénio do vetor de oxigénio para a célula e depois através do meio de cultura^{76,77}.

A maior resistência à transferência de oxigénio é a difusão do oxigénio do vetor para o meio aquoso, esta resistência é contrariada pelo aumento da área interfacial e pela acumulação de oxigénio no vetor de oxigénio, atuando como um reservatório^{74,77,83,87,93}.

Face ao que antecede, o K_La correspondente ao filme aquoso não pode ser utilizado para descrever a transferência de oxigénio neste tipo de sistemas^{74,83,87}. Segundo Cascaval *et al.*⁷⁴, as leveduras têm altas afinidades por vetores de oxigénio, isto é, as bolhas de vetor adsorvem facilmente nas células de levedura. Confirmando que a via preferencial para a transferência de oxigénio é através do vetor de oxigénio.

Contudo, segundo Dumont & Delmas⁹³ não existe nenhuma explicação adequada para a variação na área interfacial, na presença de vetor de oxigénio, foram reportados aumentos e diminuições na área interfacial. O mesmo autor também afirma que o fenómeno de incremento, da transferência de oxigénio, não pode ser atribuído ao incremento do k_L .

1.9 Objetivo

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental, (LEBA) que integra o Centro de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Algarve (CIMA). Este trabalho teve como principal objetivo o aumento da acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, através do aumento da transferência de massa de oxigénio. Como objetivos específicos procedeu-se ao:

- Estudo da influência, do número de dispersores e caudal de arejamento, no coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio.

- Estudo do efeito da transferência de massa de oxigénio no crescimento e acumulação de lípidos da levedura *R.toruloides*.
- Avaliação do efeito do vetor de oxigénio, *n*-dodecano, na produção e acumulação de lípidos.
- Efeito do controlo de pH no crescimento e acumulação lipídica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descrevem-se todos os métodos e materiais utilizados nos ensaios experimentais.

2.1 Estirpes de leveduras, meios e condições de conservação e de cultura

2.1.1 Leveduras

A levedura utilizada neste estudo foi a *Rhodospiridium toruloides* CECT 1499, adquirida no banco de Coleções Espanholas de Cultivo Tipo²⁸ (CECT), pertencentes à Universidade de Valência (Espanha).

2.1.2 Conservação de leveduras

A estirpe foi conservada a -80°C em tubos criogénicos, para utilizações mais regulares a estirpe é repicada em placas de *Petri* com meio PDA (ver capítulo 2.1.3), é incubada em estufa (Selecta, Espanha) durante 24h a 30 ± 1 °C, sendo repicada duas vezes por mês.

2.1.3 Meios de Cultura

Para o armazenamento da *R. toruloides* o meio utilizado foi o Potato Dextrose Agar⁹⁶ (PDA) constituído por 200 mL/L de infusão de batata (Anexo I), 20 g/L de glucose e 20 g/L de agar. Para a passagem da cultura para meio líquido, foi o PDA líquido, constituído por 200 mL/L de infusão de batata e 20 g/L de glucose.

O meio de cultura utilizado no inóculo foi o Yeast extract Peptone Dextrose⁹⁶ (YPD) líquido, constituído por 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glucose.

O meio para a acumulação lipídica⁹⁷ é constituído por 13 g/L glucose, 0,75 g/L extrato de levedura, 0,1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,5 g/L de MgSO₄·7H₂O e 0,4 g/L de KH₂PO₄, este meio tem um rácio C/N 70.

Todos os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal), através de calor húmido a 121 ± 1 °C durante 20 minutos.

2.2 Condições de crescimento celular

2.2.1 Preparação de inóculos e pré-inóculos

Antes da levedura ser passada para meio líquido, é necessário colocar a placa na estufa a 30 ± 1 °C durante 24h. Após este passo, a levedura foi inoculada em 50 mL de meio PDA líquido num balão erlenmeyer de 150 mL e permaneceu na agitadora orbital (IKA 4s 4000, Alemanha) a 30 ± 1 °C, 150 rpm durante 48h.

O inóculo foi inoculado com 10 % (v/v) de suspensão celular, proveniente dos 50 mL do meio anterior, em 100 mL de YPD líquido num balão erlenmeyer de 250 mL. O crescimento foi efetuado na agitadora orbital a 150 rpm e 30 ± 1 °C e monitorizado através de contagem de células, câmara de *Neubauer* (Blau Brand, Alemanha). As culturas dos diferentes ensaios foram iniciadas quando a concentração do inóculo atingiu uma concentração celular de 10^7 células/mL.

2.2.2 Crescimento em Reator Biológico

Os ensaios foram efetuados em modo descontínuo num reator biológico agitado mecanicamente (STR) de 2 L (Applikon, Holanda). Este reator está equipado com um rotor de agitação, turbina de Rushton, dispersor(es) de ar poroso(s), camisa para controlo da temperatura ligada a um termociclador, condensador e um fluxímetro para o arejamento. O ar introduzido no reator, para o arejamento, foi esterilizado pela passagem através de um filtro de membrana millipore hidrofóbica, com a porosidade de 0,2 µm, sendo o caudal de ar injetado no reator controlado por um fluxímetro. Os gases que saíram do reator passaram por um condensador, com a finalidade de diminuir as perdas de meio líquido. Após este passo, são libertados para o exterior através de uma membrana Millipore 0,2 µm. Contém ainda sondas para a determinação da concentração de oxigénio dissolvido, pH e temperatura.

O reator encontra-se ligado a uma unidade de controlo digital (Bio Controller ADI 1030 Applikon, Holanda), onde estas variáveis são controladas e monitorizadas.

Os ensaios de acumulação intracelular de lípidos são iniciados com uma concentração celular de 10^7 células/mL, proveniente do inóculo, e têm uma duração de 168 h, os crescimentos realizaram-se em 1,5 L de meio indicado para a acumulação de lípidos, cuja composição se encontra descrita no ponto 2.1.3, a uma temperatura de 30 °C e 200 rpm de agitação.

O crescimento celular, acumulação de lípidos e consumo de nutrientes foram acompanhados ao longo das 168 h de cultura, sendo recolhidas amostras de 4 em 4 h, com a exceção do período da noite. Para cada amostra foi analisada a densidade ótica por espectrofotometria, a quantificação dos lípidos totais através de fluorescência dos corpos lipídicos intracelulares por espectroscopia de fluorescência⁹⁸, concentração de biomassa por peso seco, quantificação do consumo de açúcares pelo método de DNS⁹⁹, quantificação do consumo de azoto pelo método fenol-hipoclorito¹⁰⁰, extração de lípidos pelo método de Folch¹⁰¹. A composição lipídica foi ainda analisada por HPLC¹⁰², utilizando a metodologia descrita no capítulo 2.4

2.3 Ensaios Experimentais

2.3.1. Determinação da capacidade de transferência de massa de oxigénio em reator biológico

Todos os ensaios foram executados em reator biológico de 2 L, com um volume útil de 1,5 L, equipado com uma turbina de Rushton, a 200 rpm, a 30 °C e na ausência de microrganismos.

O método utilizado na determinação do K_La foi o método dinâmico, descrito no capítulo 2.5.1

2.3.1.1. Efeito da geometria do dispersor

Neste ensaio foram testados diferentes tipos de dispersores de ar, em forma de “L” e do tipo poroso. Testou-se ainda a combinação de dois dispersores porosos em

simultâneo. Neste estudo foi utilizada água destilada e um arejamento de 0,5 *vvm* e a velocidade de agitação de 200 rpm.

2.3.1.2. Efeito do arejamento

Neste estudo foram utilizados diferentes meios, água e duas emulações de *n*-dodecano, 1 e 2 % (v/v). As condições de arejamento estudadas foram 0,5, 0,75, 1 *vvm*. Utilizou-se ainda dois dispersores porosos em simultâneo. Esta escolha é baseada nos dados obtidos no ponto 3.2.1

2.3.2. Ensaios de crescimento celular e acumulação lipídica

Todos ensaios em reator biológico agitado mecanicamente (STR), com vista ao crescimento celular e acumulação de lípidos pela *R. toruloides* CECT 1499, presentes neste capítulo decorreram como descrito em 2.2.2

2.3.2.1. Influência da utilização de *n*-dodecano como vetor de oxigénio

Realizaram-se três ensaios para estudar o efeito do vetor de oxigénio (*n*-dodecano) na acumulação lipídica da levedura *R. toruloides*. As concentrações utilizadas de *n*-dodecano foram 0, 1 e 2 % (v/v). Este vetor foi adicionado ao meio de cultura antes de se proceder à autoclavagem. O arejamento utilizado nos diferentes ensaios foi de 0,5 *vvm* utilizando um dispersor poroso, com uma agitação de 200 rpm e a uma temperatura de 30° C.

2.3.2.2. Otimização da geometria do dispersor e arejamento

Realizaram-se dois ensaios, um com adição de 1 % (v/v) de *n*-dodecano e outro sem adição de *n*-dodecano ao meio de cultura, o arejamento utilizado foi de 0,75 *vvm* usando dois dispersores porosos em simultâneo, com uma agitação de 200 rpm e a uma

temperatura de 30° C. A escolha do dispersor e arejamento recai nos resultados dos ensaios descritos em 2.3.1.

2.3.2.3. Influência do controlo de pH

Realizou-se um ensaio de modo a estudar o efeito do controlo de pH na acumulação lipídica, na presença de 1 % (v/v) de *n*-dodecano. O pH foi mantido a 5,5 durante todo o crescimento celular, sendo controlado através da adição de 5M NaOH ou 5M HCl.

Neste ensaio utilizou-se um arejamento de 0,75 vvm e dois dispersores porosos em simultâneo, com uma agitação de 200 rpm e a uma temperatura de 30° C.

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Peso seco

Nos ensaios realizados em reator, foram retiradas amostras em triplicado de 5 mL, para tubos de centrífuga, previamente pesados. A amostra foi centrifugada (Hettich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) a 5000 rpm durante 20 minutos. Separou-se o sobrenadante, que foi congelado para posteriores análise dos açúcares e azoto (capítulo 2.4.3 e 2.4.4), o *pellet* foi colocado a secar numa estufa (Binder FD53, EUA) durante, 48 h a 60 ± 1 °C. Após serem retirados da estufa, os tubos de centrífuga foram arrefecidos à temperatura ambiente (exsicador) e pesados numa balança analítica de precisão (XB 120A Precisa, Suíça).

2.4.2 Densidade ótica

A leitura da densidade ótica é um dos parâmetros utilizados para seguir o crescimento celular. Foram efetuadas leituras em triplicados das amostras de suspensão celular, estas foram analisadas num espectrofotómetro (Cintra 202 GBC, Inglaterra) a 600 nm, utilizando como branco meio de cultura. As amostras e branco estavam diluídos de 1:20.

2.4.3 Quantificação dos açúcares

O método utilizado para a quantificação dos açúcares foi de acordo com Miller⁹⁹. Este método baseia-se no facto de o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) ser reduzido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, na presença de açúcares redutores, formando um complexo de cor acastanhada que pode ser quantificado espectrofotometricamente a 540 nm.

Esta quantificação foi efetuada, em triplicado, com o sobrenadante proveniente do peso seco (capítulo 2.4.1). Foram adicionados em tubos de ensaio 1 mL de amostra e 1 mL de reagente DNS, seguidamente foram agitados e colocados num banho-maria a 100 °C durante 5 minutos. Após terem arrefecido, adicionaram-se 10 mL de água destilada, agitaram-se e leram-se as densidades óticas a 540 nm. O branco foi realizado da mesma forma, mas utilizou-se água destilada em vez de amostra.

Recorreu-se a uma curva padrão para converter os valores da densidade ótica em concentração (g/L). Para a obtenção da curva padrão, foram preparadas seis soluções de glucose, com concentrações entre 0 e 1 g/L, aplicou-se o método anteriormente referido, obtendo assim a curva padrão que é representada graficamente pelas densidades óticas em função das concentrações de açúcar conhecidas (Anexo IV).

2.4.4 Quantificação de azoto amoniacal

Esta quantificação foi efetuada, em triplicado, com o sobrenadante proveniente do peso seco (capítulo 2.4.1). O método aplicado para a quantificação do azoto foi o método do fenol-hipoclorito descrito por Weatherburn¹⁰⁰. Este método consiste na alteração de cor da solução de nitroprussiato com fenol e hipoclorito com solução alcalina, passando de transparente a azul, na presença amónia.

A sensibilidade do método melhora com a utilização de nitroprussiato de sódio, que funciona como catalisador, possibilitando determinações de quantidades vestigiais de amónia.

Prepararam-se duas soluções, uma de fenol com nitroprussiato (solução A) e outra de hipoclorito alcalino (solução B). Para a solução A foram adicionados 5 g de fenol com 25 mg de nitroprussiato de sódio, perfez-se com água destilada até 500 mL

de solução. A solução B, adicionou-se 2,5 g de hidróxido de sódio com 4,2 mL de hipoclorito de sódio para 500 mL de solução, perfazendo com água destilada. As soluções foram preparadas antes dos ensaios e protegidas da luz.

Foram adicionados em tubos de ensaio 20 µL de sobrenadante e 5 mL de solução A e 5 mL de solução B, agitou-se em cada adição, seguidamente foram colocados num banho-maria a 37 °C durante 20 minutos. Após ter arrefecido, leram-se as densidades óticas a 625 nm. O branco foi preparado da mesma forma, mas utilizou-se água destilada em vez de amostra.

Utilizou-se uma curva padrão para converter os valores da densidade ótica em concentração (g/L). Para a obtenção da curva, foram preparadas seis soluções de (NH₄)₂SO₄, com concentrações entre 0 e 1,5 g/L, aplicou-se o método anteriormente referido, obtendo assim a curva padrão que é representada graficamente pelas densidades óticas em função das concentrações já conhecidas (Anexo V)

2.4.5 Quantificação de lípidos por fluorescência

Os lípidos acumulados encontram-se num organelo intracelular, chamado de corpo lipídico. Estes lípidos podem ser corados por um corante lipofílico, como o vermelho de nilo, e quantificados por espectroscopia de fluorescência, de acordo com o método descrito por Kimura *et al.*¹⁰³, utilizando vermelho de nilo.

Foi preparada uma solução de corante composta por, 0,1 mg de (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one (vermelho de nilo; Fluka Analytical) em 1 mL de acetona.

Foram efetuadas leituras em triplicados das amostras de suspensão celular, estas foram analisadas num fluorímetro (F-4500, Hitachi), com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão entre 400 e 700 nm.

Primeiramente foi analisado o branco, adicionou-se numa cuvette de quartzo 2 mL de tampão PBS (Anexo II) e 0,1 mL de amostra, registando-se o espectro através do *software FL Solutions v2.0*. Em seguida adicionou-se 10 µL de solução corante, na mesma covette, e registou-se o espectro. O valor de fluorescência relativa foi obtido pela diferença entre os dois espectros, com e sem solução corante, entre os comprimentos de onda de 565 e 575 nm.

De forma a representar as unidades de fluorescência em termos de concentração (g/L) de lípidos, construiu-se uma curva padrão baseada no método descrito por Bertozzini *et al.*¹⁰⁴. Utilizando a trioleína (C₅₇H₁₀₄O₆), triacilglicerol formado a partir do ácido oleico, como referencia. Para a obtenção desta curva padrão, foram preparadas seis soluções de trioleína em isopropanol, com concentrações entre 0 e 5 g/L, aplicando-se a metodologia anteriormente referida, para a quantificação da fluorescência. A curva padrão que foi representada graficamente, apresentando as unidades de fluorescência (UF) em função das concentrações de trioleína (Capítulo 3.1).

2.4.6 Extração de lípidos pelo método de Folch

A extração dos lípidos intracelulares da levedura *R. toruloides* foi efectuada com base no método de Folch *et al.*¹⁰¹, adaptada a este tipo de cultura. As extrações foram efetuadas em triplicado, as amostras de suspensão celular foram sujeitas a diversos choques térmicos, seguidas de sonicação (VC600 VibraCell Ultrasonic Processor, EUA) durante 5 minutos, com pulsos de 30 segundos, com repetições de 3 vezes. Seguidamente foram centrifugadas (Hettrich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) a 5000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado uma mistura de clorofórmio/metanol 2:1 (v/v), numa proporção vinte vezes superior ao volume de amostra. A homogeneização foi realizada durante 5 minutos, num agitador de vortex. Após agitação, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante 20 minutos e reservou-se a fase líquida. Para garantir a separação de fases, adicionou-se 1/5 volumes de NaCl a 0,1 %, sendo a mistura homogeneizada e centrifugada a 2000 rpm durante 5 segundos. Posteriormente, recolheu-se a fase inferior e evaporou-se o clorofórmio através de um evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha). A quantidade de lípidos extraídos (gramas) é igual à diferença entre o peso do balão com os lípidos e ao peso do balão.

A percentagem (p/p) de lípidos intracelulares extraídos em função do peso seco, foi obtido através da seguinte equação:

$$\%_{\text{lípidos}} = \frac{\text{massa de lípidos extraídos (g)}}{\text{massa de células utilizada (g)}} \times 100\%$$

(Equação 10)

2.4.7 Análise do perfil de ácidos gordos

Para que seja possível analisar o perfil lipídico da *R. toruloides* CECT 1499 por HPLC é necessário hidrolisar os triglicéridos obtidos na extração. O método utilizado na hidrólise é baseado no método DGF-Einheitsmethoden modificado¹⁰².

Primeiramente, colocaram-se 2 g de lípidos, provenientes da extração, num balão juntamente com 50 mL de uma solução a 0,5 M de KOH dissolvido em etanol 96 %. Colocou-se a mistura em ebulição num sistema de aquecimento por refluxo. Após uma hora em ebulição e com a solução ainda quente, transfere-se para um funil de extração de 500 mL e lava-se com água destilada (50 mL), adicionando-se em seguida uma solução de H₂SO₄ 5M até ser atingido um pH de 5. Adicionou-se 40 mL de clorofórmio juntamente com a mistura, numa ampola de decantação. Aguardou-se a separação de fases e recolheu-se a fase inferior, sendo esta filtrada, para um *vial*, com filtro de seringa de diâmetro de poro de 0,2 µm (Milipore).

A coluna utilizada nesta análise foi uma Alltima Alltech Hi-Load C18 (Grace), incorporada num HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom) constituído por um forno (L-2300), um auto injetor (L-2200), um detetor (IR L-2490) e uma bomba (L-2130). As análises de identificação do perfil de ácidos gordos foram realizadas a 30 °C utilizando como fase móvel uma mistura de água/acetonitrilo (1:99) a um fluxo de 1,2 mL/min, previamente filtrada com um filtro 0,22 µm (Milipore) e sonicada num banho de sonicação (Ultrason - Salecta) durante 30 min (Anexo VI).

2.5 Caracterização da cinética de crescimento

2.5.1 Taxa específica de crescimento

A determinação da taxa específica de crescimento (μ), expressa em h⁻¹, foi feita a partir de um programa de modelação *on-line* DMFit (<http://modelling.combase.cc>),

que se baseia em modelos matemáticos de aproximação, em que a determinação da taxa específica de crescimento é a variação do logaritmo natural do peso seco em função do tempo de fermentação.

2.5.2 Tempo de duplicação celular

A (Equação 11) representa o cálculo do tempo de duplicação (td), expresso em h.

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

(Equação 11)

2.5.3 Cálculos de rendimentos

2.5.3.1. Rendimento de biomassa em função do substrato

O rendimento de biomassa produzida (x) em função do substrato consumido (S) corresponde ao declive calculado por regressão linear dos valores de biomassa produzida em relação à glucose consumida. Este rendimento $Y_{x/S}$ é expresso em g biomassa produzida / g glucose consumida.

2.5.3.2. Rendimento lípidos em função de substrato

O rendimento de lípidos produzidos (L) em função do substrato consumido (S) é expresso em g lípidos produzidos / g glucose consumida. Este rendimento $Y_{L/S}$ corresponde ao declive calculado por regressão linear dos valores de lípidos produzidos em relação à glucose consumida.

2.5.3.1. Rendimento de lípidos em função de biomassa

Assim como os rendimentos anteriores, o rendimento de lípidos produzidos (L) em função da biomassa produzida (x) corresponde ao declive calculado por regressão

linear dos valores de lípidos produzidos em relação à biomassa produzida. Este rendimento $Y_{L/x}$ é expresso em g lípidos produzidos / g biomassa produzida.

2.5.4 Produtividade máxima de lípidos

A produtividade máxima de lípidos é expressa em g/L.h, sendo os lípidos máximos a concentração máxima de lípidos na cultura, expressos em g/L e o tempo de cultura a que foi atingida a máxima concentração lipídica, $t_{\text{lípidos máximos}}$ em h.

A produtividade máxima de lípidos foi obtida através da seguinte equação.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Lípidos}_{\text{máximo}}}{t_{\text{Lípidos}_{\text{máximo}}}}$$

(Equação 12)

2.5.1 Determinação do K_La

O método utilizado para a determinação do K_La foi o método dinâmico. Este método permite avaliar o efeito da velocidade de agitação e caudal de arejamento na transferência de oxigénio para o meio aquoso.

Este método consiste na remoção de oxigénio, através da injeção de azoto no meio aquoso, até que este se encontre numa concentração de oxigénio dissolvido muito baixa, próximo de 0 %. Em seguida o meio é arejado, sendo o incremento da concentração de oxigénio dissolvido ao longo do tempo monitorizado e registado.

O aumento da concentração de oxigénio dissolvido é descrito pela (Equação 13).

$$\frac{dC}{dt} = K_La (C^* - C)$$

(Equação 13)

Onde C^* é a concentração de saturação do oxigénio dissolvido e C é a concentração de oxigénio dissolvido no líquido.

Integrando a (Equação 13) é possível a obtenção do valor de K_La , sendo igual ao simétrico do declive da reta resultante da representação de $\ln (C^* - C)$ em função de t^{75} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA) foram efetuados ensaios para determinar parâmetros fisiológicos e metabólicos, relacionados com a acumulação lipídica, de forma a avaliar a estirpe *Rhodospiridium toruloides* CECT 1499. Um dos pontos focados foi a otimização do rácio C/N, tendo já sido obtidos resultados indicativos que o rácio C/N 70 poderia alterar o metabolismo da *R. toruloides* CECT 1499, canalizando a fonte de carbono para a acumulação de lípidos intracelulares. Sabe-se também que o oxigénio influencia a produção e acumulação de lípidos. Estudos preliminares realizados com *n*-dodecano, como vetor de oxigénio, apresentam resultados promissores na sua aplicação⁹⁷.

Assim, numa primeira fase, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do *n*-dodecano na acumulação lipídica da *R. toruloides* CECT 1499, em reator biológico mecanicamente agitado (STR). Posteriormente à avaliação da influência do *n*-dodecano, procedeu-se ao estudo das condições de operação, tais como a geometria do dispersor e taxa de arejamento, com objetivo de aumentar a transferência de massa de oxigénio. Realizou-se também um estudo que consiste na convergência das duas abordagens anteriores, efeito do *n*-dodecano e otimização das condições operacionais, com o objetivo de juntar as vantagens das duas abordagens. Por fim, avaliou-se o efeito do controlo do pH ao longo do crescimento, com vista à melhoria dos parâmetros de crescimento e acumulação lipídica.

3.1 Curva padrão de trioleína

Neste estudo uma das formas de quantificar os lípidos produzidos pela *R. toruloides* foi por espectroscopia de fluorescência, em que o valor é expresso em unidades de fluorescência. O objetivo deste ensaio foi a representação das unidades de fluorescência em termos de concentração (g/L) de lípidos, construindo-se uma curva padrão baseada no método descrito por Bertozzini *et al.*¹⁰⁴. Como referência foi utilizada a trioleína (C₅₇H₁₀₄O₆), triacilglicerol formado a partir do ácido oleico, como descrito no capítulo 2.4.5

As unidades de fluorescência raramente são utilizadas como unidade de quantificação de lípidos, não permitindo o cálculo de rendimentos e produtividades.

Assim as unidades de fluorescência, obtidas por espectroscopia de fluorescência através do método Kimura *et al.*¹⁰³ foram convertidas em concentração (g/L).

Para calcular a concentração (g/L) de lípidos intracelulares foram preparadas seis soluções de trioleína, com concentrações entre 0 e 5 g/L. As amostras foram efetuadas em triplicado, a Figura 10 representa a curva padrão obtida.

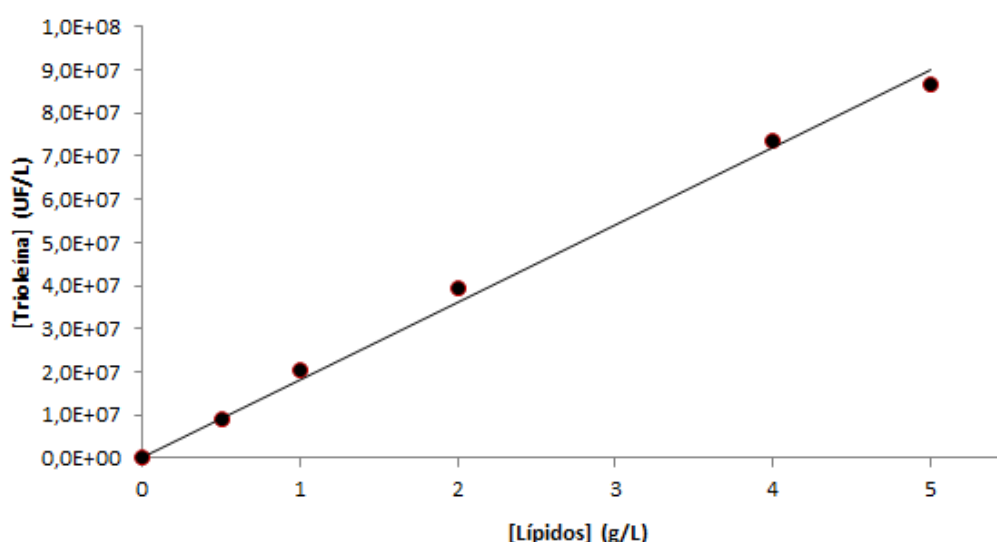


Figura 10. Curva padrão de trioleína. Unidades de fluorescência de trioleína obtidas através do método descrito por Kimura *et al.*¹⁰³, utilizando vermelho de nilo. Equação da regressão linear obtida: $[Trioleína, UF/L] = 1,806 \times 10^7 [Lípidos, g/L]$; $R^2 = 0.995$. Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

Todos os valores relativos à concentração de lípidos, presentes nos seguintes capítulos, foram obtidos através da curva padrão representada na Figura 10.

3.2 Determinação da capacidade de transferência de massa de oxigênio em reator biológico

Todos ensaios em reator biológico agitado mecanicamente (STR), com vista ao crescimento celular e acumulação de lípidos pela *R. toruloides* CECT 1499, presentes neste capítulo decorreram como descrito em 2.2.2

3.2.1. Efeito da geometria e número de dispersor na capacidade de transferência de massa de oxigénio

Para estudar o efeito dos diferentes dispersores nos valores de K_{La} foram efetuados vários ensaios, nos quais foram alterados os tipos de dispersor. Os dispersores utilizados foram o dispersor em forma de “L”, poroso e dois porosos em simultâneo. As condições de operação utilizadas no reator biológico STR 2 L, com volume útil de 1,5 L foram 30 ± 1 °C de temperatura, agitação 200 rpm, uma turbina de Rushton e um arejamento de 0,5 vvm.

Os vários valores de K_{La} obtidos com diferentes dispersores são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico com diferentes dispersores em reator biológico STR 2 L, 1,5 L de volume útil, a uma temperatura de 30 ± 1 °C, arejamento de 0,5 vvm, agitação de 200 rpm com uma turbina de Rushton

	Dispersor em “L”	Dispersor poroso	Dois dispersores porosos
K_{La} (h ⁻¹)	$10,981 \pm 0,900$ ^c	$34,512 \pm 0,700$ ^b	$41,226 \pm 2,098$ ^a

Valores médios (n=3) \pm erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P < 0.05$).

Os resultados da tabela 1 mostram que o menor valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio (K_{La}) foi obtido com o dispersor em forma de “L”, seguido do dispersor poroso. Resultados idênticos foram obtidos por Raposo *et al.*¹⁰⁵ Estes autores verificaram que o crescimento da suspensão de *Centaurea calcitrapa* e produção de proteases era condicionado devido à limitação de oxigénio que ocorria quando era usado o dispersor em forma de “L”. Este tipo de dispersor promove a formação de bolhas de grande dimensão, com subsequente baixo tempo de residência no reator, enquanto que o dispersor poroso produz microbolhas, promovendo a transferência de massa gás-líquido, através do aumento da área interfacial de contacto e tempo de residência no interior do reator, logo, melhor transferência e acessibilidade do oxigénio às culturas. Esta situação melhora significativamente, cerca de 16 %, com a alteração da geometria através da associação de dois dispersores porosos, dispostos paralelamente entre si, obtendo-se um K_{La} de $41,23 \text{ h}^{-1}$.

Além dos fatores referidos, o aumento da área interfacial de contacto, a diminuição do tamanho das bolhas de ar e o aumento do tempo de permanência das

bolhas de ar no reator, verifica-se também uma melhor distribuição e homogeneidade das bolhas de ar no seio do reator, favorecendo a transferência de massa de oxigênio no reator.

3.2.2. Influência do arejamento na capacidade de transferência de massa de oxigênio

Com o intuito de estudar o efeito do arejamento na transferência de massa de oxigênio, K_{La} , foram realizados ensaios, nos quais se variou o caudal de arejamento, utilizando meios sem e com adição de *n*-dodecano nas concentrações de 1 e 2 % (v/v). Os caudais de arejamento testados neste ensaio foram de 0,5, 0,75 e 1 *vvm*, em reator biológico STR 2 L, equipado com uma turbina de Rushton, 1,5 L de volume útil, temperatura 30 ± 1 °C e agitação 200 rpm.

Com base nos resultados do estudo anterior (ponto 3.2.1), utilizaram-se dois dispersores porosos em simultâneo para introduzir o arejamento no reator biológico, uma vez que foi onde se verificou que esta combinação apresentou o K_{La} mais elevado.

Na Tabela 2 são apresentados os valores de K_{La} determinados a diferentes caudais de arejamento e dispersões aquosas com *n*-dodecano.

Tabela 2. Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico com diferentes caudais de arejamentos e diferentes dispersões de *n*-dodecano em reator biológico STR 2 L (1,5 L de volume útil), a uma temperatura de 30 ± 1 °C, agitação de 200 rpm com uma turbina de Rushton e arejamento efetuado através de dois dispersores porosos em conjunto.

	K_{La} (h ⁻¹)		
	0,5 <i>vvm</i>	0,75 <i>vvm</i>	1 <i>vvm</i>
Sem <i>n</i>-dodecano	41,225 ± 2,098 ^d	60,474 ± 0,497 ^a	60,796 ± 0,723 ^a
1 % <i>n</i>-dodecano	36,354 ± 0,253 ^e	48,079 ± 0,772 ^c	55,869 ± 1,615 ^b
2 % <i>n</i>-dodecano	34,246 ± 0,164 ^e	50,457 ± 0,485 ^c	53,012 ± 1,296 ^b

Valores médios (n=3) ± erro padrão, valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Na ausência de *n*-dodecano o aumento da taxa de arejamento de 0,5 para 0,75 *vvm* traduziu-se num aumento do valor de K_{La} , obtendo-se um valor máximo de 60,796 h⁻¹ (Tabela 2). Contudo o aumento de 0,75 *vvm* para 1 *vvm* não provoca melhorias no K_{La} sendo os dois valores de K_{La} estatisticamente iguais. Apesar do aumento de

arejamento verifica-se uma diminuição do tempo de residência das bolhas de ar no reator, assim como um aumento do tamanho de bolha de ar, devido a uma maior pressão à saída dos dispersores, a área interfacial diminui consequentemente.

Analisando os valores da Tabela 2 das soluções com *n*-dodecano, observa-se que o aumento do caudal de arejamento provoca um aumento na transferência de massa de oxigénio.

É notório que a presença de *n*-dodecano não proporciona melhorias nos valores de K_{La} , segundo Dumont & Delmas⁹³ o K_{La} não é o parâmetro mais indicado para classificar o impacto dos vetores de oxigénio. Este facto deve-se a várias interações entre a bolha de ar e as gotículas de vetor, influenciando a área interfacial do sistema.

A diminuição dos valores de K_{La} entre as duas concentrações de *n*-dodecano, poderá dever-se a um aumento da viscosidade aparente do meio dificultando assim a transferência de oxigénio da fase gasosa para a fase líquida⁷⁷.

3.3 Crescimento da levedura *Rhodosporidium toruloides* em reator agitado mecanicamente

3.3.1 Influência do vetor *n*-dodecano no crescimento e acumulação lipídica

A aplicação de vetores de oxigénio em culturas microbianas pode melhorar a disponibilidade e acessibilidade de oxigénio. Estes vetores, tais como *n*-dodecano, têm uma solubilidade para o oxigénio cerca de 20 vezes superior, quando comparada com água^{68,77,86,88}.

Para compreender melhor a influência do *n*-dodecano na produção e acumulação de lípidos intracelulares, realizaram-se três ensaios com 0, 1 e 2 % de *n*-dodecano em reator biológico STR de 2L.

O crescimento celular iniciou-se com uma concentração celular de 10^7 células/ml, as preparações dos pré-inóculos assim como das composições dos meios encontram-se descritos nos capítulos 2.2 e 2.1.3 respetivamente. O reator biológico foi operado a uma agitação de 200 rpm, a uma temperatura de 30 ± 1 °C e com um arejamento de 0,5 vvm através de um dispersor poroso. Recolheram-se amostras ao longo do perfil de crescimento da levedura sendo realizadas análises para a

quantificação dos parâmetros de crescimento celular e de acumulação de lípidos, como descrito no capítulo 2.2.2 .

Na Figura 11 e Tabela 3 estão representados os perfis e parâmetros cinéticos e de eficiência do crescimento celular e da acumulação lipídica.

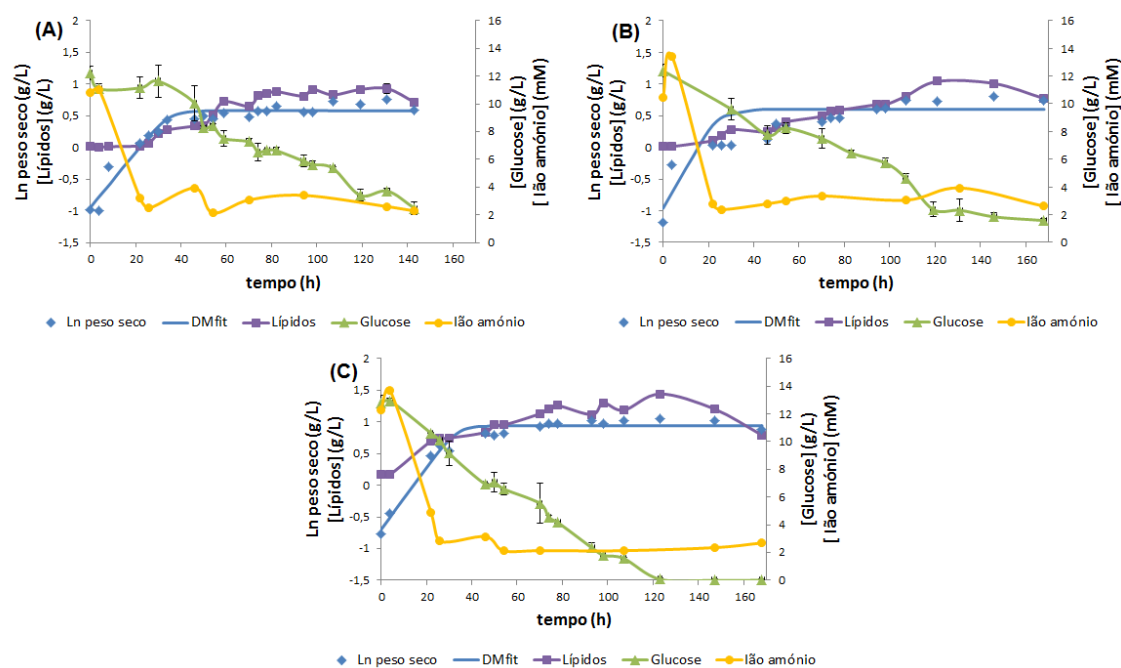


Figura 11. Perfil de crescimento e de acumulação lipídica da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499. (A) sem *n*-dodecano, (B) 1% de *n*-dodecano e (C) 2% de *n*-dodecano. O crescimento decorreu durante 168 h, em reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0,5 vvm através de um dispersor poroso.

Tabela 3. Parâmetros de crescimento da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499, com diferentes concentrações de *n*-dodecano, em reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0,5 vvm através de um dispersor poroso.

	Concentração de <i>n</i> -dodecano		
	0 % (v/v)	1 % (v/v)	2 % (v/v)
μ (h ⁻¹)	0,0443 ± 0,0044 ^b	0,0672 ± 0,0075 ^a	0,0544 ± 0,0035 ^{ab}
X _{máx} (g/L)	2,078 ± 0,039 ^b	2,254 ± 0,034 ^b	2,850 ± 0,101 ^a
Lípidos _{máx} (g/L)	0,936 ± 0,061 ^b	1,042 ± 0,006 ^b	1,447 ± 0,037 ^a
t lípidos _{máx} (h)	131	121	123
Glucose residual (%)	27,86	12,78	0,58
Y _{x/s} (g/g)	0,0973 ± 0,0074 ^a	0,1270 ± 0,0173 ^a	0,0972 ± 0,0103 ^a
Y _{L/s} (g/g)	0,0887 ± 0,0079 ^a	0,0935 ± 0,0048 ^a	0,0664 ± 0,0026 ^b
Y _{L/x} (g/g)	0,4275 ± 0,0604 ^b	0,6194 ± 0,0271 ^a	0,5000 ± 0,0389 ^b
Produtividade (g/L.h)	0,00711 ± 0,00046 ^c	0,00862 ± 0,00004 ^b	0,01173 ± 0,00030 ^a
K _L a (h ⁻¹)	34,512 ± 0,700 ^a	28,477 ± 0,490 ^b	27,275 ± 1,727 ^b

Valores de taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos_{máx}), glucose residual, rendimento de biomassa relativamente ao substrato (Y_{x/s}), de lípidos em relação ao substrato (Y_{L/s}), de lípidos em relação à biomassa (Y_{L/x}), produtividade de lípidos acumulados (produtividade) e K_La inicial (K_La). Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Em análise à Figura 11, verifica-se que a adição de *n*-dodecano no meio de crescimento diminui a fase de latência. A fase exponencial está fortemente condicionada pela presença de azoto e quando este atinge valores limitantes a levedura reduz drasticamente a divisão celular, canalizando a glucose para a biossíntese de lípidos e posterior acumulação lipídica^{35,38}. Esta ocorrência é verificável na Figura 11, sendo completamente transversal à adição de *n*-dodecano. A acumulação de lípidos é intensificada na fase estacionária de crescimento, após a fase de crescimento ativo cessar. No final da fase estacionária, aproximadamente 130 h de cultura, os lípidos acumulados começam a ser consumidos, este acontecimento poderá estar relacionado com a escassez da fonte de carbono.

Analisando a Figura 11 e a Tabela 3, observa-se que as culturas crescidas na presença de *n*-dodecano apresentaram maior crescimento, através do aumento na concentração de biomassa e uma maior acumulação lipídica, relativamente à cultura sem adição do vetor de oxigénio. Este vetor, o *n*-dodecano, aumenta a solubilidade do oxigénio em soluções aquosas, relativamente à água, o que implica que haja uma maior

quantidade de oxigénio disponível para as células. Neste caso, o oxigénio disponível poderá influenciar fortemente o crescimento celular, devido ao metabolismo da *R. toruloides* ser estritamente aeróbio, o que se refletiu num aumento considerável da taxa específica de crescimento chegando a um máximo de $0,0672 \text{ h}^{-1}$ na presença de 1 % *n*-dodecano (Tabela 3). Outro aspeto influenciado, pela maior disponibilidade de oxigénio, foi a produção de biomassa que atingiu um máximo de 2,850 g/L com 2 % *n*-dodecano. Num crescimento, uma maior produção de biomassa, poderá refletir-se num elevado consumo de glucose. Assim na ausência de *n*-dodecano 28 % da glucose inicial não foi consumida, enquanto que na presença de 2% de *n*-dodecano a quantidade de glucose foi residual (Tabela 3). Pensa-se que tal facto possa ser explicado, uma vez que os metabolismos celulares têm uma elevada exigência de oxigénio e a presença de *n*-dodecano aumenta a acessibilidade de oxigénio para as células, induzindo a uma maior atividade metabólica e consequentemente ao aumento do consumo de glucose.

Na presença 2 % *n*-dodecano a concentração de lípidos alcançou um máximo de 1,447 g/L. O mecanismo de acumulação lipídica de leveduras oleaginosas, como a *R. toruloides*, tem um alto requisito de oxigénio. Sendo exemplo disso a produção de citrato, precursores da biossíntese de lípidos, para a formação de duas moles de citrato são consumidas, pela célula, três moles de oxigénio⁶⁸. Este mecanismo também requer grandes quantidades de energia sendo esta proveniente da respiração celular^{14,38,64–66}.

Na avaliação do efeito do vetor de oxigénio no meio de cultura os rendimentos são importantes indicadores, nomeadamente o rendimento correspondente à produção de lípidos em função da biomassa produzida ($Y_{L/x}$) que atingiu um valor máximo de 0,6194 g lípidos/g biomassa com 1 % *n*-dodecano, ou seja 61,94 % (p/p) do peso da sua biomassa é constituída por lípidos. Este dado corrobora a influência positiva da adição de *n*-dodecano, assim como o consumo eficiente da fonte de carbono para a biossíntese e acumulação de lípidos pela *R. toruloides* CECT 1499. O rendimento $Y_{L/x}$ está muito próximo dos valores obtidos na literatura, variando estes entre 58,3 e 67,5 %^{36,37,61}.

O tempo em que é alcançado o máximo de lípidos acumulados diminuiu aproximadamente 10 horas, com a adição do vetor de oxigénio, o que juntamente com uma maior acumulação lipídica proporciona um aumento de mais de 150 % do valor da produtividade, aumentando de 0,00711 g/L.h, sem adição de vetor, para 0,01173 g/L.h, com 2 % de *n*-dodecano (Tabela 3).

No entanto, os valores de K_{La} são contraditórios, ou seja, a adição de *n*-dodecano provoca uma diminuição do K_{La} o que indica que a taxa transferência de

oxigénio o meio aquoso é menor. Como referido anteriormente, no ponto 3.2.2 o K_{La} não é o parâmetro o mais indicado para classificar o impacto dos vetores de oxigénio, no fornecimento de oxigénio às células⁹³. É também de salientar que o mecanismo mais plausível de transporte de oxigénio da fase gasosa para as células é a adsorção do vetor de oxigénio na superfície da bolha de ar, ocorrendo primeiramente a transferência de oxigénio do vetor para a célula e só depois através do meio de cultura^{76,77,83}.

Noutro trabalho¹⁰⁶, realizado no LEBA, o *n*-dodecano influenciou negativamente os valores de K_{La} , contudo os parâmetros de crescimento apresentaram melhorias.

Em termos gerais a adição de *n*-dodecano em baixas concentrações melhora a capacidade da *R. toruloides* CECT 1499 em produzir e acumular de lípidos intracelulares.

3.3.2 Otimização da geometria e número de dispersor e arejamento na acumulação lipídica

De forma a compreender melhor a influência do oxigénio na produção e acumulação de lípidos, realizou-se um estudo em reator biológico STR de 2 L, com um volume útil de 1,5 L, em que foi utilizado um arejamento de 0,75 *vvm* através de dois dispersores porosos em simultâneo, com um K_{La} de 60,474 h⁻¹. A alteração da geometria do dispersor e taxa de arejamento foi baseada nos valores de K_{La} provenientes do ponto 3.2.2, em que se verificou que com a junção de dois dispersores porosos e o aumento do caudal de arejamento se obtinha um K_{La} mais elevado.

O reator foi operado com agitação de 200 rpm e temperatura de 30 ± 1 °C. O crescimento celular iniciou-se com uma concentração celular de 10⁷ células/ml, as preparações dos pré-inóculos assim como das composições dos meios estão descritos nos capítulos 2.2 e 2.1.3 respetivamente. Foram igualmente efetuadas análises para a quantificação dos parâmetros de crescimento celular e de acumulação lipídica (capítulo 2.2.2).

A Figura 12 representa os perfis de acumulação lipídica e crescimento celular da levedura na presença de dois dispersores porosos e um arejamento de 0,75 *vvm*. Na Tabela 4 são representados os parâmetros do crescimento celular e acumulação de lípidos. Os resultados obtidos são comparados com a cultura crescida com apenas um dispersor poroso e um arejamento de 0,5 *vvm*.

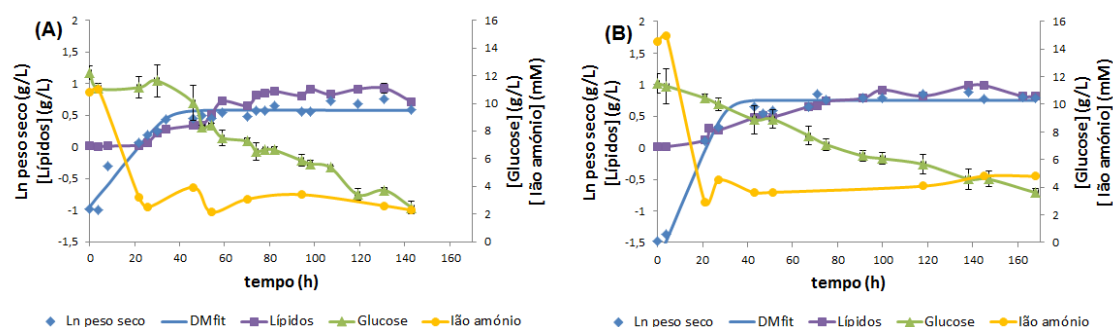


Figura 12. Perfil de crescimento e de acumulação lipídica da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499. (A) arejamento de 0,5 vvm através de um dispersor poroso. (B) arejamento de 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo. O crescimento decorreu durante 168 h, em reator biológico STR 2L, a 30 °C e 200 rpm.

Tabela 4. Parâmetros de crescimento da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499, com diferentes geometrias de dispersor em reator biológico STR 2 L, a 30 °C e 200 rpm.

	Arejamento	
	0,5 vvm [*]	0,75 vvm ^{**}
μ (h ⁻¹)	0,0443 ± 0,0044 ^b	0,0845 ± 0,0089 ^a
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	2,078 ± 0,039 ^b	2,412 ± 0,098 ^a
Lípidos _{máx} (g/L)	0,936 ± 0,061 ^a	0,991 ± 0,005 ^a
t lípidos _{máx} (h)	131	138
Glucose residual (%)	27,86	22,58
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,0973 ± 0,0074 ^a	0,1256 ± 0,0179 ^a
$Y_{L/s}$ (g/g)	0,0887 ± 0,0079 ^a	0,1122 ± 0,0148 ^a
$Y_{L/x}$ (g/g)	0,4275 ± 0,0604 ^b	0,6091 ± 0,0441 ^a
Produtividade (g/L.h)	0,00711 ± 0,00046 ^a	0,00712 ± 0,00004 ^a
K_{La} (h ⁻¹)	34,512 ± 0,700 ^b	60,474 ± 0,497 ^a

* Arejamento através de um dispersor poroso, dados do capítulo 3.3.1 Tabela 3.

** Arejamento através de dois dispersores porosos em simultâneo

Valores de taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos_{máx}), glucose residual, rendimento de biomassa relativamente ao substrato ($Y_{x/s}$), de lípidos em relação ao substrato ($Y_{L/s}$), de lípidos em relação à biomassa ($Y_{L/x}$), produtividade de lípidos acumulados (produtividade) e K_{La} inicial (K_{La}). Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

As curvas de crescimento da Figura 12, vêm reforçar resultados já discutidos no capítulo 3.3.1, nomeadamente o início da acumulação lipídica estar intimamente relacionado com a escassez da fonte de azoto^{35,38}, que ocorre após 20 h de cultura. Assim como o consumo de lípidos no final da fase estacionária estar relacionado com a escassez da fonte de carbono.

A alteração da geometria do dispersor e arejamento resultou numa assimilação de glucose pelas células mais acentuada, verificando-se uma redução da glucose residual de 27,86 % para 22,58 %, refletindo-se este valor no aumento da produção de biomassa, concomitante com a maior oxigenação da cultura no reator com dois dispersores (0,75 *vvm*), pelo que a glicólise e subsequente a atividade respiratória estaria mais intensa.

Neste ensaio, assim como no ensaio com *n*-dodecano (ponto 3.3.1) a fase estacionária foi antecipada 7 h, relativamente à cultura com apenas um dispersor e arejamento de 0,5 *vvm*. Este fator poderá dever-se à otimização da geometria do dispersor e arejamento proporcionar um maior fornecimento de oxigénio à célula, deixando este parâmetro de limitar o crescimento celular, sendo apenas a escassez de azoto a limita-lo, uma vez que este é residual nesta fase.

A alteração de um dispersor poroso com um arejamento de 0,5 *vvm* para dois dispersores porosos em simultâneo com um arejamento de 0,75 *vvm*, proporcionaram valores de K_La superiores, de 34,512 h^{-1} para 60,474 h^{-1} , respetivamente (Tabela 4), o que significa uma menor resistência à transferência de oxigénio, sendo por isso o oxigénio consumido restituído mais rapidamente⁷⁹, resultando numa taxa específica de crescimento e biomassa máxima produzida de 0,0845 h^{-1} e 2,412 g/L, respetivamente. Neste caso, a biomassa produzida está dependente da quantidade de azoto disponível, mas também com a disponibilidade de oxigénio existente no meio.

A concentração máxima de lípidos produzidos, não apresenta uma melhoria significativa. No entanto é de notar que, com a otimização da geometria e taxa de arejamento, os lípidos acumulados representam 60,9 % (p/p) do peso da biomassa total, enquanto que sem otimização apenas 42,7 % (p/p) da biomassa são lípidos, o que significa que houve maior acumulação por grama de biomassa.

Embora os rendimentos $Y_{x/S}$ e $Y_{L/S}$, sejam estatisticamente idênticos, os valores obtidos com os dois dispersores e aumento do arejamento são superiores (0,0973 e 0,0887 g/g, respetivamente) aos obtidos com apenas um dispersor e arejamento de 0,5 *vvm* (0,1256 e 0,112 g/g, respetivamente), como se pode observar na Tabela 4. O rendimento de produção de lípidos relativamente à biomassa é igualmente superior, 0,61 g lípidos/g biomassa, relativamente ao ensaio com um dispersor, observando-se um incremento de 30 % na acumulação lipídica. O que sugere que o mecanismo de acumulação lipídica é influenciado pela disponibilidade de oxigénio.

Este ensaio juntamente com o ensaio do ponto 3.3.1 , permitem afirmar que uma maior disponibilidade de oxigênio aparenta melhorar a eficiência, da *R. toruloides* CECT 1499, em acumulação de lípidos intracelulares. Li *et al.*⁶⁶ teve conclusões semelhantes sobre a influência da disponibilidade de oxigênio na produção e acumulação de lípidos intracelulares da *R. toruloides*.

3.3.3 Efeito do vetor de oxigênio e da geometria e número de dispersor no crescimento e na acumulação lipídica

Com base nos resultados obtidos anteriormente, no que diz respeito à influência do *n*-dodecano (ponto 3.3.1) e da melhoria da geometria do dispersor e caudal de arejamento (ponto 3.3.2) na transferência de oxigênio da fase gasosa para a célula, observou-se uma melhoria no crescimento e acumulação lipídica da levedura. Foi realizado um ensaio que combina essas duas abordagens, com vista a melhorar a produção e acumulação de lípidos através de uma maior disponibilidade de oxigênio.

O reator foi operado com agitação de 200 rpm, temperatura de 30 ± 1 °C, arejamento de 0,75 *vvm* através de dois dispersores porosos e na presença de 1% *n*-dodecano. O crescimento celular iniciou-se com uma concentração celular de 10^7 células/ml, as preparações dos pré-inóculos assim como das composições dos meios estão descritos nos capítulos 2.2 e 2.1.3 respectivamente. Foram efetuadas análises para a quantificação dos parâmetros de crescimento celular e de acumulação lipídica, como descrito no capítulo 2.2.2 .

O critério de escolha em utilizar 1 % (v/v) de *n*-dodecano em vez de 2 % (v/v) baseou-se nos parâmetros obtidos no capítulo 3.3.1 (Tabela 3), nomeadamente no rendimento correspondente à produção de lípidos em função da biomassa produzida. Por fim, e não menos importante, foi necessário ter em conta o custo relativamente alto dos vetores de oxigênio. Numa escala industrial para que o processo seja economicamente viável o vetor deverá ser utilizado numa concentração mais baixa possível.

A Figura 13 representa os perfis de acumulação lipídica e crescimento celular e na Tabela 5 estão representados os parâmetros do crescimento celular e acumulação de lípidos.

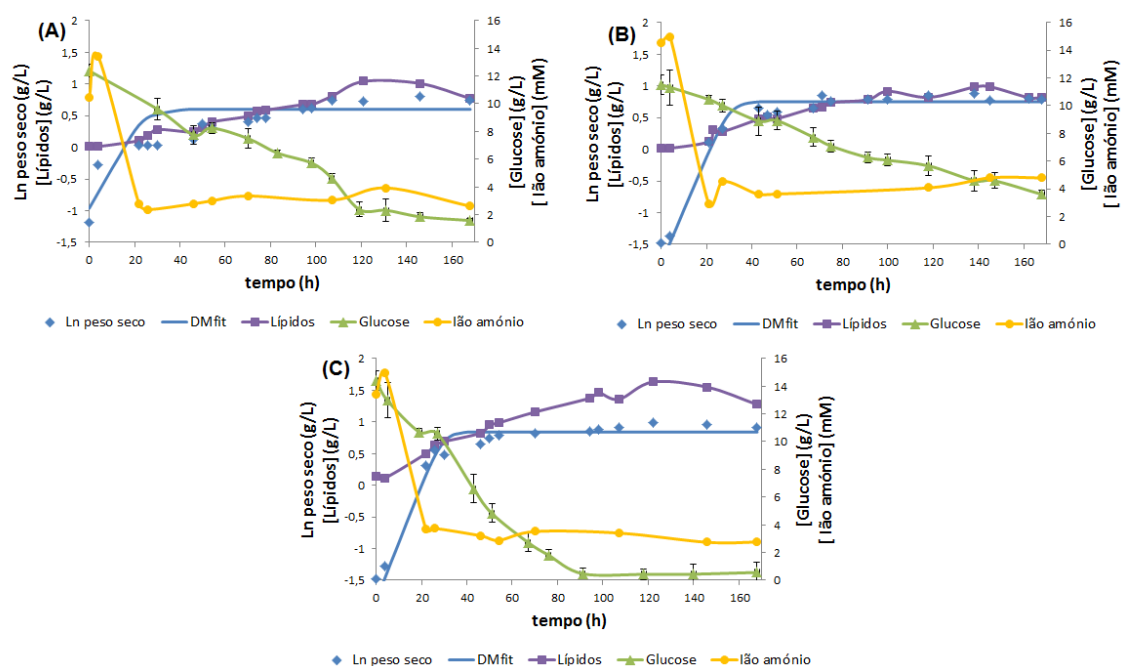


Figura 13. Perfil de crescimento e de acumulação lipídica da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499. (A) 1% *n*-dodecano e arejamento de 0,5 vvm através de um dispersor poroso. (B) sem adição de *n*-dodecano e arejamento de 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo. (C) 1% *n*-dodecano e arejamento de 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo. O crescimento decorreu durante 168 h, em reator biológico STR 2L, a 30 °C e 200 rpm.

Tabela 5. Parâmetros de crescimento da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499, com diferentes geometrias de dispersor na presença de diferentes concentrações de *n*-dodecano em reator biológico STR 2 L, a 30 °C e 200 rpm.

	Arejamento		
	0,5 vvm	0,75 vvm	
<i>n</i> -dodecano	1 % (v/v)*	0 % (v/v)**	1 % (v/v)
μ (h ⁻¹)	0,0672 ± 0,0075 ^{ab}	0,0845 ± 0,0089 ^a	0,0845 ± 0,0077 ^a
X _{máx} (g/L)	2,254 ± 0,034 ^b	2,412 ± 0,098 ^b	2,678 ± 0,064 ^a
Lípidos _{máx} (g/L)	1,042 ± 0,006 ^b	0,991 ± 0,005 ^b	1,634 ± 0,017 ^a
t lípidos _{máx} (h)	121	138	122
Glucose residual (%)	12,78	22,58	8,30
Y _{x/s} (g/g)	0,1270 ± 0,0173 ^a	0,1256 ± 0,0179 ^a	0,1312 ± 0,0302 ^a
Y _{L/s} (g/g)	0,0935 ± 0,0048 ^b	0,1122 ± 0,0148 ^{ab}	0,1278 ± 0,0096 ^a
Y _{L/x} (g/g)	0,6194 ± 0,0271 ^a	0,6091 ± 0,0441 ^a	0,7301 ± 0,0603 ^a
Produtividade (g/L.h)	0,00862 ± 0,00004 ^b	0,00712 ± 0,00004 ^c	0,01345 ± 0,00014 ^a
K _{La} (h ⁻¹)	28,477 ± 0,490 ^c	60,474 ± 0,497 ^a	48,079 ± 0,772 ^b

* Arejamento através de um dispersor poroso, dados do capítulo 3.3.1, Tabela 3

** Arejamento através de dois dispersores porosos em simultâneo, dados do capítulo 3.3.2, Tabela 4

Valores de taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos_{máx}), glucose

residual, rendimento de biomassa relativamente ao substrato ($Y_{x/s}$), de lípidos em relação ao substrato ($Y_{L/s}$), de lípidos em relação à biomassa ($Y_{L/x}$), produtividade de lípidos acumulados (produtividade) e K_La inicial (K_{La}). Valores médios ($n=3$) \pm erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P<0.05$).

As curvas de crescimento da Figura 13, possuem perfis de crescimento semelhantes, verifica-se que não possuem fase de adaptação, a fase exponencial em (C) é mais prolongada em aproximadamente 10 h. É também visível um consumo de glucose mais acentuado até ao esgotamento total, cerca das 90 h. Após a fase exponencial, observa-se uma desaceleração do crescimento e o início da acumulação lipídica, a produção máxima de lípidos ocorre no final da estacionária, entre as 120 e 140 h de cultura. A junção de abordagens não apresenta melhorias nos parâmetros de crescimento celular, sendo esta afirmação corroborada pelas Figura 13 (B) e (C) e também pelos dados apresentados na Tabela 5, nomeadamente a taxa específica de crescimento e biomassa máxima $0,0845 \text{ h}^{-1}$ e $2,678 \text{ g/L}$, respetivamente. Sendo estes valores similares aos obtidos com a otimização da geometria do dispersor e taxa de arejamento, $0,0845 \text{ h}^{-1}$ e $2,412 \text{ g/L}$, taxa específica de crescimento e biomassa máxima, respetivamente. A adição de *n*-dodecano 1% (v/v) no ensaio realizado com dois dispersores e arejamento de $0,75 \text{ vvm}$ prefigurou uma acumulação de lípidos praticamente linear ao longo das fases exponencial e estacionária de crescimento, atingindo o valor lipídico mais elevado ($1,634 \text{ g/L}$). É aparente que a partir deste valor a fonte de carbono, já esgotada, conduziu a que os lípidos fossem consumidos como fonte de carbono.

O efeito desta combinação influenciou a produção de biomassa e produção de lípidos, sendo estes estatisticamente diferentes, relativamente aos restantes ensaios apresentados na Tabela 5. Também, o rendimento de lípidos acumulados em relação à biomassa foi superior com um valor de 73,01 % (p/p) da sua biomassa.

Como discutido anteriormente nos pontos 3.3.1 e 3.3.2, o K_La , não é o parâmetro mais indicado para classificar o fornecimento de oxigénio às células, na presença de vetores de oxigénio⁹³. Este facto poderá dever-se aos mecanismos envolvidos nos processos de transferência de massa de oxigénio não serem mensuráveis através do K_La , nomeadamente se a transferência de massa de oxigénio ocorrer diretamente do vetor para a célula^{76,77,83}. Uma das hipóteses que poderia ser levantada era o vetor de oxigénio, que é um hidrocarboneto, ser consumido pela levedura aumentando assim a acumulação de lípidos, contudo a *R. toruloides* apresenta elevada

afinidade para com a glucose^{26,28}, sendo o substrato preferencial da maior parte dos microrganismos. Em todos os ensaios é verificável que quando a glucose se torna limitante os lípidos acumulados são consumidos pela levedura.

Estes dados juntamente com os dados obtidos nos pontos 3.3.1 e 3.3.2 fornecem fortes indicações de que oxigénio é um fator decisivo na produção e acumulação de lípidos na levedura *R.toruloides* e que o vetor de oxigénio, *n*-dodecano, contribuiu para o aumento de acessibilidade do oxigénio no meio de reação.

3.3.4 Influência do controlo de pH na acumulação lipídica

Os ensaios anteriores permitem verificar a influência do oxigénio na acumulação de lípidos intracelulares, pela *R.toruloides* CECT 1499. A adição de *n*-dodecano ao meio de cultura em baixas concentrações, a otimização da geometria do dispersor e taxa de arejamento promovem uma maior disponibilidade de oxigénio à célula, consequentemente aumenta a produção e acumulação de lípidos. Contudo a produtividade e o rendimento de lípidos produzidos em relação ao substrato produzido são inferiores aos encontrados na literatura^{36,37,61}.

A baixa produtividade e rendimento possivelmente estão relacionados com a síntese e excreção de ácido cítrico. Este ácido é um dos intermediários na produção de lípidos, sendo sintetizado no ciclo de Krebs para a formação de acetil- CoA^{16,38,40}. Quando existem elevadas concentrações intracelulares de citrato a celular excreta-o para o meio extracelular^{22,41}, acidificando o meio.

Em todos os ensaios anteriormente referidos, o pH do meio baixava de 5,5 para aproximadamente 3.48, nas primeiras 24 horas. O intervalo de pH ótimo, para leveduras oleaginosas, está entre 4 e 7⁵⁹. Segundo Gill *et al.*³⁵, o efeito do pH na acumulação e composição lipídica é mínimo.

No entanto, para identificar mais concretamente a influência da manutenção do pH a 5,5 na acumulação de lípidos intracelulares pela *R.toruloides* CECT 1499, foi realizado um ensaio em reator biológico STR de 2 L com controlo de pH ao longo do tempo de cultura, mantendo o pH a 5,5.

O crescimento celular iniciou-se com uma concentração celular de 10⁷ células/ml, as preparações dos pré-inóculos assim como das composições dos meios

estão descritos nos capítulos 2.2 e 2.1.3 respetivamente. Efetuaram-se análises para a quantificação dos parâmetros de crescimento celular e de acumulação de lípidos (capítulo 2.2.2).

O reator biológico foi operado a uma agitação de 200 rpm, a uma temperatura de 30 ± 1 °C e com um arejamento de 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo e com adição de 1 % (v/v) *n*-dodecano. O pH foi controlado através da adição de 5M NaOH ou 5M HCl.

Na Figura 14 e Tabela 6 estão representados os perfis e parâmetros, respetivamente, de acumulação lipídica e crescimento celular.

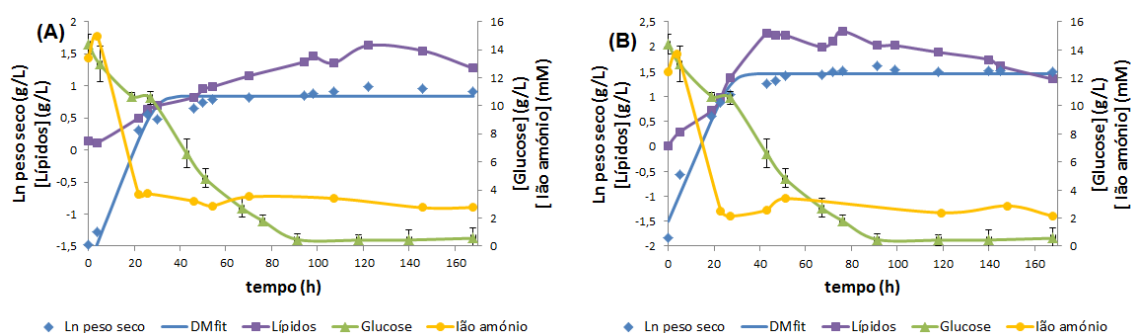


Figura 14. Perfil de crescimento e de acumulação lipídica da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499. (A) sem correção de pH. (B) com correção de pH para 5,5. O crescimento decorreu durante 168 h, em reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo.

Tabela 6. Parâmetros de crescimento da levedura *Rhodosporidium toruloides* CECT 1499, com e sem controlo de pH com adição de 1% *n*-dodecano, em reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo.

	1 % <i>n</i> -dodecano	
	Sem controlo de pH*	Com controlo de pH
μ (h ⁻¹)	0,0845 ± 0,0077 ^a	0,1087 ± 0,0091 ^a
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	2,678 ± 0,064 ^b	5,010 ± 0,047 ^a
Lípidos máx (g/L)	1,634 ± 0,017 ^b	2,232 ± 0,055 ^a
t lípidos máx (h)	122	43
Glucose residual (%)	8,30	2,97
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,1312 ± 0,0302 ^b	0,2321 ± 0,0210 ^a
$Y_{L/s}$ (g/g)	0,1278 ± 0,0096 ^b	0,1867 ± 0,0193 ^a
$Y_{L/x}$ (g/g)	0,7301 ± 0,0603 ^a	0,7554 ± 0,0639 ^a
Produtividade (g/L.h)	0,01345 ± 0,00014 ^b	0,05296 ± 0,00108 ^a

*Dados provenientes do capítulo 3.3.3 Tabela 5

Valores de taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), concentração máxima de lípidos acumulados ($\text{Lípidos}_{\text{máx}}$), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados ($t_{\text{lípidos}_{\text{máx}}}$), glucose residual, rendimento de biomassa relativamente ao substrato ($Y_{x/s}$), de lípidos em relação ao substrato ($Y_{L/s}$), de lípidos em relação à biomassa ($Y_{L/x}$) e produtividade de lípidos acumulados (produtividade). Valores médios ($n=3$) \pm erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P<0.05$).

Analisando as curvas de crescimento da Figura 14, verifica-se que ambos os crescimentos celulares em reator biológico da levedura *R. toruloides*, com e sem controlo de pH, têm consumos de glucose e perfis de crescimento semelhante, sem fase de latência, fase exponencial de aproximadamente 30 h. Ambos os ensaios entram em total fase estacionária, após a escassez da fonte de azoto.

A escassez de glucose, por sua vez força as células a consumir os lípidos acumulados, sendo verificável na Figura 14 (B) às 80 h de cultura.

No ensaio em que houve controlo do pH a 5,5, o máximo de concentração lipídica foi antecipado cerca de 79 h, atingindo-se o máximo às 43 h enquanto que na cultura sem controlo de pH foi apenas às 122 h de cultura. Em termos de implementação em maior escala, este aspeto é de extrema importância, reduzindo significativamente a duração do ciclo produtivo.

O controlo do pH promove maiores produções de biomassa e lípidos, aumentando a biomassa para perto do dobro, atingindo um valor máximo de 5,010 g/L e aumentando a produção de lípidos em cerca de 27 %, com um valor máximo de 2,232 g/L (Tabela 6).

A produtividade aumentou em cerca de quatro vezes, passando de 0,014 para 0,053 g/L.h, com o controlo de pH a 5,5. Outro dos parâmetros influenciados pela correção de pH, ao longo da cultura, foi o rendimento da biomassa produzida em função do substrato consumido ($Y_{x/s}$) com valores de 0,2321 g biomassa / g substrato. O rendimento de lípidos produzidos em relação ao substrato consumido ($Y_{L/s}$) também apresenta valores superiores, com a correção de pH, aumentando de 0,1278 para 0,1867 g lípidos / g substrato, este valor está próximo dos valores observados na literatura, variando estes entre 0,173 e 0,230^{36,37,52,53,61} g lípidos / g substrato.

Contudo a da correção de pH não interferiu no rendimento de lípidos produzidos em função da biomassa produzida ($Y_{L/x}$) sendo valor obtido neste ensaio, 0,7554 g lípidos / g biomassa, idêntico ao obtido sem correção de pH, 0,7301 g lípidos / g biomassa. Apesar da retificação do pH não interferir no $Y_{L/x}$, o valor obtido é superior aos encontrados em

alguns estudos efetuados com diferentes estirpes de *R.toruloides*, que variam entre 0,56 e 0,68^{36,37,52,53,61} g lípidos / g biomassa.

O controlo do pH do meio de cultura é benéfico no crescimento celular. Esta influência positiva pode dever-se ao facto de o pH do meio, quando não se encontra na zona ótima do pH fisiológico da célula, poder promover uma pressão osmótica mais elevada, forçando a célula a um maior dispêndio de energia, devido à ativação de várias bombas de prótons para a hidrólise de ATP e equilíbrio do pH intracelular. Estas bombas permitem que a composição iónica e o pH intracelular se mantenham constantes¹⁴. Com o controlo de pH a célula não necessita de despende quantidades elevadas de energia nestes mecanismos, canalizando-a para outras vias metabólicas, como sendo a síntese de lípidos.

Porém, o controlo de pH ao longo do crescimento celular não exerceu qualquer tipo de influência a nível de acumulação de lípidos, o rendimento $Y_{L/x}$ é semelhante com e sem controlo de pH. Este resultado é corroborado pelos estudos realizados por *Brown et al.*¹⁰⁷ e *Ratledge*¹⁶, demonstrando que meios de cultura com pH ácidos ou ligeiramente ácidos favorecem a acumulação lipídica.

3.4 Análise do perfil de ácidos gordos

A extração dos lípidos intracelulares foi efetuada com base no método de *Folch et al.*¹⁰¹, descrito no ponto 2.4.6. Para que seja possível analisar o perfil de ácidos gordos por HPLC é necessário hidrolisar os triglicéridos obtidos na extração. O método utilizado na hidrólise é baseado no método DGF-Einheitsmethoden modificado¹⁰², descrito no ponto 2.4.7.

Os perfis lipídicos analisados foram os dos crescimentos celulares com controlo de pH com 1% de *n*-dodecano, 0,75 vvm e dois dispersores porosos em simultâneo. É necessário ter em conta que estas extrações ocorreram no final do crescimento e não quando se obteve o máximo de lípidos intracelulares. Segundo *Turcotte e Kosaric*¹⁰⁸, o perfil lipídico altera-se com o decorrer da cultura, sendo produzidos e acumulados mais lípidos saturados com o aumento da idade da cultura.

Na Tabela 7 estão representados os ácidos gordos maioritários em termos de composição percentual (p/p).

Tabela 7. Perfil de ácidos gordos da levedura *R.toruloides* CECT 1499 no final dos crescimentos celulares em comparação com o perfil de ácidos gordos que constituem outros óleos e outras estirpes.

	Perfil de ácidos gordos (% p/p)				
	Palmítico (16:0)	Estearico (18:0)	Oleico (18:1)	Linoleico (18:2)	Outros
<i>R.toruloides</i> CECT 1499 ^a	-	8,07	58,73	21,34	11,85
<i>R.toruloides</i> CECT 1499 ^b	-	2,74	61,54	24,63	11,09
<i>R.toruloides</i> CECT 1499 ^{97 c}	-	7,09	63,89	21,78	7,24
<i>R.toruloides</i> DMKU3-TK16 ^{54 d}	22,49	14,56	41,54	15,12	6,29
<i>R.toruloides</i> Y4 ^{37 e}	26,40	5,50	61,50	3,10	3,5
Óleo de milho ¹⁰⁹	11,80	2,00	24,80	61,30	0,10
Óleo de palma ¹⁰⁹	35,00	7,00	44,0	14,00	-
Óleo de colza ¹¹⁰	3,50	0,9	64,10	22,30	9,20
Óleo de soja ¹¹⁰	13,90	2,10	23,20	56,20	4,60

^a Crescimento celular com controlo de pH com adição de 1% *n*-dodecano, em reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo (capítulo 3.3.4).

^b Crescimento celular com adição de 1% *n*-dodecano, em reator biológico STR 2L, a 30 °C, 200 rpm e 0,75 vvm através de dois dispersores porosos em simultâneo (capítulo 3.3.3).

^c Crescimento celular em reator biológico STR 2L, a 29 °C, 200 rpm e 0,5 vvm através de um dispersor poroso.

^d Crescimento celular em erlenmeyer de 250 mL, a 30 °C e 150 rpm.

^e Crescimento celular em erlenmeyer de 250 mL, 30 °C e 200 rpm.

Em análise ao perfil de ácidos gordos dos lípidos obtidos nas culturas de *R.toruloides* CECT 1499^{a,b,c} (Tabela 7) verifica-se que, com uma variação mínima entre as percentagens, em que os ácidos gordos maioritários são o ácido oleico e linoleico. Contudo, o perfil de ácidos gordos da *R.toruloides* CECT 1499^{a,b} poderá estar incorreto devido ao tempo de retenção dos padrões de ácido palmítico e oleico serem muito próximo, 10.62 e 10.54 min, respetivamente. Ambas as amostras provenientes dos ensaios, têm tempos de retenção de 10.55 min, assumindo assim que se trata do ácido oleico.

A diferença obtida entre as culturas com e sem controlo de pH, *R.toruloides* CECT 1499^{a,b}, poderá dever-se ao pH do meio de cultura ser diferente e poder induzir a formação de diferentes ácidos gordos, devido às variações de pH do meio. Segundo Kraisintu *et al.*⁵⁴, a temperatura, oxigénio, substrato e pH, influenciam a eficiência com que os lípidos são acumulados, verificando-se um aumentando no ácido esteárico e uma diminuição dos ácidos oleico e linoleico.

A adição do vetor de oxigênio, *R.toruloides* CECT 1499^{b,c}, também provocou alterações no perfil de ácidos gordos. A diferença obtida poderá dever-se à presença do *n*-dodecano, quando este é adicionado influencia a transferência de massa de oxigênio e como consequência o perfil de ácidos gordos.

O ácido palmítico não foi detectado nos crescimentos de *R.toruloides* CECT 1499^{a,b,c}, contudo está presente nos crescimentos de *R.toruloides* DMKU3-TK16⁵⁴ e Y4³⁷, similarmente o ácido linoleico está presente em baixas quantidade no crescimento de *R.toruloides* Y4³⁷ e em maiores quantidades nas restantes. Em ambos os estudos efetuados pelos autores acima referidos, as condições de cultura e operação são diferentes, nomeadamente no crescimento de *R.toruloides* Y4³⁷ a acumulação é provocada pela escassez de fósforo. Como referido anteriormente o perfil de ácidos gordos das leveduras oleaginosas depende da espécie e das condições de crescimento⁵⁴.

Na Tabela 7 estão presentes vários óleos utilizados na produção de biodiesel, óleo de milho¹⁰⁹, palmeira¹⁰⁹, colza¹¹⁰ e soja¹¹⁰, o perfil de ácidos gordos do óleo de colza é similar ao perfil da *R.toruloides* CECT 1499, podendo assim sugerir-se que os lípidos produzidos por esta levedura são indicados para a produção de biodiesel.

4. CONCLUSÃO

A produção e acumulação de lípidos intracelulares requerem um estudo extensivo de todos os mecanismos intervenientes no processo. A escolha de um meio de cultura adequado e de baixo custo, assim como a otimização das condições operacionais, são fatores a ter em conta quando se inicia um processo de produção e acumulação de lípidos intracelulares microbianos.

Neste trabalho estudou-se a influência do aumento da transferência de massa de oxigénio no crescimento celular e na acumulação de lípidos pela levedura *R.toruloides* CECT 1499, crescida em reator biológico (STR) de 2 L. Para isso, foram traçadas estratégias de forma a aumentar a acessibilidade e disponibilidade de oxigénio às células e avaliar o efeito deste na acumulação lipídica.

O aumento da transferência de massa de oxigénio, para que não se torne limitante para a levedura e promova a produção e acumulação lipídica intracelular, foi otimizado usando três parâmetros operacionais, o número e geometria dos dispersores, assim como o caudal de arejamento. Conjugaram-se dois dispersores porosos e aumentou-se o caudal de arejamento, estas alterações no desenho e condições operacionais do reator resultaram num aumento dos valores de K_La para cerca do dobro. Esta taxa de transferência de massa de oxigénio mais elevada, por sua vez, promoveu o aumento da biomassa e a acumulação de lípidos ao longo da curva de crescimento, sendo estes resultados similares aos obtidos na presença de 1 % (v/v) *n*-dodecano, 0,5 vvm e um dispersor poroso, relativamente à acumulação lipídica. Os resultados obtidos com esta abordagem sugerem que o oxigénio é um fator importante na produção e acumulação de lípidos, sendo a levedura oleaginosa *R.toruloides* dependente da presença deste elemento para uma produção e acumulação lipídica mais eficiente. Este facto é explicado pelo seu metabolismo ser estritamente aeróbio^{26,28}.

Uma outra estratégia para intensificar a disponibilidade de oxigénio às células foi a adição de diferentes concentrações de *n*-dodecano, hidrocarboneto saturado em que o oxigénio apresenta alta solubilidade comparativamente com a água. Funcionando como vetor no transporte do oxigénio para o meio de cultura, fase líquida, e subsequentemente para a célula, fase sólida. Verificou-se que este vetor de oxigénio promove aumento do conteúdo lipídico intracelular e da biomassa produzida.

Embora as duas abordagens anteriores tenham mostrado um aumento na acumulação de lípidos, decidiu-se conjugar o aumento do número e geometria de dispersores e taxa de arejamento com a adição de *n*-dodecano à cultura de *R.toruloides*. Esta nova estratégia permitiu à levedura acumular e produzir maiores quantidades de lípidos comparativamente as quantidades alcançadas pelas abordagens individualmente, obtendo-se a acumulação de lípidos mais elevada.

O controlo do pH do meio de cultura a 5,5 mostrou ser igualmente importante para que o processo de crescimento celular e acumulação de lípidos intracelulares fosse mais rápido e eficiente. Os parâmetros relacionados com o crescimento celular apresentaram melhorias com o controlo do pH a 5,5, sendo também a produção e acumulação lipídica influenciada de forma positiva. Porém a capacidade de acumulação de lípidos não apresentou melhorias, o rendimento de lípidos produzidos por unidade de biomassa produzida foi muito similar com e sem o controlo do pH.

Em termos de resultados globais deste trabalho, pode concluir-se que a levedura *R. toruloides* CECT 1499 é fortemente condicionada pela presença de oxigénio, particularmente na biossíntese de lípidos. As alterações do número e geometria do dispersor e do caudal de arejamento oferecem uma valiosa contribuição para o aumento da transferência de massa de oxigénio. Por sua vez, o uso de *n*-dodecano como vetor de oxigénio aumenta a acessibilidade e disponibilidade de oxigénio. Ambas contribuindo para uma maior produção e acumulação de lípidos intracelulares.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras e de forma a completar e clarificar alguns pontos deste trabalho, seria importante:

- Realizar mais ensaios variando as condições de agitação e a tipo de agitadores, uma vez que apenas a foram otimizadas as condições de arejamento e geometria do dispersor.
- Comprovar o efeito da oxigenação através do monitoramento do consumo de oxigénio.
- Explorar com maior detalhe o efeito do pH.
- Mantendo o rácio C/N constante, aumentar a quantidade de fonte de carbono e a de azoto, de forma a que a fonte de carbono não entre em níveis limitativos condicionando a produção de biomassa.
- Avaliar a produção de óleos a outros produtos de elevado valor, como por exemplo a produção de carotenoides, pigmentos de elevado valor.

BIBLIOGRAFIA

1. Kerr, R. A. Climate change. Global warming is changing the world. *Science* **316**, 188–90 (2007).
2. Ragauskas, A. J. *et al.* The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* **311**, 484–9 (2006).
3. Aguiar, F. O Negócio em Biocombustíveis. in *ShareBiotech Local Technology Meeting, Projeto AlfaEtilico Bioenergia de 2^a geração* (2012).
4. EBB-European Biodiesel Board. at <<http://www.ebb-eu.org/>>. Julho de 2013
5. Lima-Costa, M. E., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B. & Peinado, J. M. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **39**, 789–97 (2012).
6. Escobar, J. C., Lora E. S., Venturini, O. J., Yáñez E. E., Castillo, E. F., Almazan, O. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **13**, 1275–1287 (2009).
7. Sivakumar, G. Vail, D. R., Xu, J., Burner, D. M., Lay Jr, J. O., Ge, X., Weathers, P. J. Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. *Engineering in Life Sciences* **10**, 8–18 (2010).
8. EEP-Europ's Energy Portal. at <<http://www.energy.eu/>>. Junho de 2013
9. Gerpen, J. Van. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology* **86**, 1097–1107 (2005).
10. Gouveia, L., Marques, A. E., da Silva, T. L. & Reis, A. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **36**, 821–6 (2009).
11. Zhang, Y., Dubé, M. A., McLean, D. D. & Kates, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology* **89**, 1–16 (2003).
12. Körbitz, W. Biodiesel production in Europe and North America, an encouraging prospect. *Renewable Energy* **16**, 1078–1083 (1999).
13. Meher, L., Vidyasagar, D. & Naik, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **10**, 248–268 (2006).
14. Campbell, M. K. & Farrell, S. O. *Biochemistry*. 7th Edition. Belmont. (Cengage Learning, 2011).
15. Knothe, G. “Designer” Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties. *Energy & Fuels* **22**, 1358–1364 (2008).
16. Ratledge, C. in *Biotechnology: Products of Secondary Metabolism*. Vol.7. (Kleinkauf, H. & Döhren, H. von) 133–198 (Wiley VCH, 1997).
17. Srivastava, A. & Prasad, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **4**, 111–133 (2000).
18. Ma, F. & Hanna, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresource technology* **70**, 1–15 (1999).

-
19. Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribe Larrea, J. L., Jouve, C. M., Nicaud, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in lipid research* **48**, 375–87 (2009).
 20. Li, Q., Du, W. & Liu, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology* **80**, 749–56 (2008).
 21. Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P. & Villa, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology* **90**, 1219–27 (2011).
 22. Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G. & Marc, I. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek* **80**, 215–224 (2001).
 23. UniProt-The Universal Protein Resource. at <<http://www.uniprot.org/>>. Junho de 2013
 24. Ratledge, C. & Wynn, J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology* **51**, 1–51 (2002).
 25. Atkinson, B. & Mavituna, F. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. 2nd Edition. New York. (Stockton Pr, 1991).
 26. MycoBank-International Mycological Association. at <<http://www.mycobank.org/>>. Julho de 2013.
 27. NCBI-National Center for Biotechnology Information. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Junho de 2013.
 28. CECT- Colección Española de Cultivo Tipo. at <<http://www.cect.org/>>. Maio de 2013
 29. Oloke, J. K. Teleomorphism in Speciation. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* **1**, 68–72 (2006).
 30. Ratledge, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society transactions* **30**, 1047–1050 (2002).
 31. Certik, M. & Shimizu, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of bioscience and bioengineering* **87**, 1–14 (1999).
 32. Somashekar, D. & Joseph, R. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C / N ratio of the growth medium. *World journal of microbiology & biotechnology* **16**, 491–493 (2000).
 33. Zhao, X., Peng, F., Du, W., Liu, C. & Liu, D. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess and biosystems engineering* **35**, 993–1004 (2012).
 34. Granger, L., Goma, G. & Pareilleux, A. Applied o . Microbiology Biotechnology Kinetics of growth and fatty acid production of *Rhodotorula glutinis*. *Applied microbiology and biotechnology* **37**, 13–17 (1992).
 35. Gill, C. O., Hall, M. J. & Ratledge, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose in culture . Lipid Accumulation in an Oleaginous Yeast (*Candida 107*) Growing on Glucose in Single-Stage Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology* **33**, 231–239 (1977).
-

-
36. Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q. & Zhao, Z. K. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology* **102**, 1803–1807 (2011).
 37. Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X. & Zhao, Z. K. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology* **101**, 6124–6129 (2010).
 38. Ratledge, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* **86**, 807–15 (2004).
 39. Botham, P. A. & Ratledge, C. A Biochemical Explanation for Lipid Accumulation in *Candida* 107 and Other Oleaginous Micro-organisms. *Journal of General Microbiology* **114**, 361–375 (1979).
 40. Evans, C. T., Scragg, A. H. & Ratledge, C. A Comparative Study of Citrate Efflux from Mitochondria of Oleaginous and Non-oleaginous Yeasts. *European Journal of Biochemistry* **130**, 195–204 (2005).
 41. Evans, C. T. & Ratledge, C. The Physiological Significance of Citric Acid in the Control of Metabolism in Lipid-Accumulating Yeasts. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **3**, 349–376 (1985).
 42. Kosa, M. & Ragauskas, A. J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. *Trends in biotechnology* **29**, 53–61 (2011).
 43. Wynn, J. P., Kendrick, A. & Ratledge, C. Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids* **32**, 605–610 (1997).
 44. Wynn, J. P., Hamid, A. A. & Ratledge, C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology (Reading, England)* **145**, 1911–1917 (1999).
 45. Zhang, Y., Adams, I. P. & Ratledge, C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 2013–25 (2007).
 46. Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S. & Leonardi, A. in *Biodiesel-Feedstock and Processing Technologies* (Stoytcheva, M. & Montero, G.) 71–92 (InTech, 2011). doi:10.5772/1094
 47. Czabany, T., Athenstaedt, K. & Daum, G. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et biophysica acta* **1771**, 299–309 (2007).
 48. Athenstaedt, K. & Daum, G. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *European journal of biochemistry / FEBS* **266**, 1–16 (1999).
 49. Gibellini, F. & Smith, T. K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB life* **62**, 414–28 (2010).
 50. Coleman, R. A. & Lee, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research* **43**, 134–176 (2004).
 51. RG-refgene. at <<http://refgene.com>>. Junho de 2013
 52. Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H. & Zhao, Z. K. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **38**, 627–32 (2011).
-

-
53. Wiebe, M. G., Koivuranta, K., Penttilä, M. & Ruohonen, L. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC biotechnology* **12**, 26 (2012).
 54. Kraisintu, P., Yongmanitchai, W. & Limtong, S. Selection and Optimization for Lipid Production of a Newly Isolated Oleaginous Yeast , *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. **445**, 436–445 (2010).
 55. Uçkun Kiran, E., Salakkam, A., Trzcinski, A. P., Bakir, U. & Webb, C. Enhancing the value of nitrogen from rapeseed meal for microbial oil production. *Enzyme and microbial technology* **50**, 337–42 (2012).
 56. Vamvakaki, A.-N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M. & Papanikolaou, S. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by *Zygomycetes*. *Engineering in Life Sciences* **10**, 348–360 (2010).
 57. Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T. & Bourtoom, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* **46**, 210–218 (2011).
 58. Papanikolaou, S., Diamantopoulou, P., Chatzifragkou, A., Philippoussis, A. & Aggelis, G. Suitability of Low-Cost Sugars as Substrates for Lipid Production by the Fungus *Thamnidium elegans*. *Energy & Fuels* **24**, 4078–4086 (2010).
 59. Karatay, S. E. & Dönmez, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource technology* **101**, 7988–7990 (2010).
 60. Huang, Q. *et al.* Effects of selected ionic liquids on lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource technology* **130**, 339–44 (2013).
 61. Li, Y., Zhao, Z. (Kent) & Bai, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* **41**, 312–317 (2007).
 62. Andrade, R., Leal, R., Roseiro, J., Reis, A. & da Silva, T. L. Monitoring *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch fermentations growing under carbon and nitrogen limitation by flow cytometry. *World journal of microbiology & biotechnology* **28**, 1175–84 (2012).
 63. Zhao, X. *et al.* Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **37**, 581–5 (2010).
 64. Ahmed, S. U., Singh, S. K., Pandey, A., Kanjilal, S. & Prasad, R. B. N. Fatty acid profiling during microbial lipid production under varying pO₂ and impeller tip speeds. *Applied biochemistry and biotechnology* **151**, 599–609 (2008).
 65. Choi, S. Y., Ryu, D. D. & Rhee, J. S. Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and bioengineering* **24**, 1165–72 (1982).
 66. Li, Y., Liu, B., Zhao, Z. & Bai, F. Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology* **22**, 650–656 (2006).
 67. Briffaud, J. & Engasser, J. Citric acid production from glucose. II. Growth and excretion kinetics in a trickleflow fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* **21**, 2093–2111 (1979).
 68. Jianlong, W. Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using n-dodecane as an oxygen-vector. *Process Biochemistry* **35**, 1079–1083 (2000).
-

-
69. Rane, K. D. & Sims, K. A. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095. *Biotechnology and bioengineering* **43**, 131–7 (1994).
70. Bati, N., Hammond, E. G. & Glatz, B. A. Biomodification of fats and oils: Trials with *Candida lipolytica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61**, 1743–1746 (1984).
71. Yen, H. W. & Zhang, Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bioscience and bioengineering* **112**, 71–4 (2011).
72. Lima-Costa, M. E. & Raposo, S. in *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações* (Fonseca, M. M. & Teixeira, J. A.) 441–454 (2007).
73. Garcia-Ochoa, F. & Gomez, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances* **27**, 153–76 (2009).
74. Cascaval, D., Galaction, a.-I., Folescu, E. & Turnea, M. Comparative study on the effects of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeasts broths. *Biochemical Engineering Journal* **31**, 56–66 (2006).
75. Stanbury, P. F., Hall, S. & Whitaker, A. in *Principles of Fermentation Technology* 243–275 (Butterworth-Heinemann, 1999).
76. McMillan, J. D. & Wang, D. I. C. Enhanced Oxygen Transfer Using Oil-in-Water Dispersions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **506**, 569–582 (1987).
77. Rols, J. L., Condoret, J. S., Fonade, C. & Goma, G. Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors. *Biotechnology and bioengineering* **35**, 427–35 (1990).
78. Liu, Y. S. & Wu, J. Y. Use of n-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Journal of applied microbiology* **101**, 1033–8 (2006).
79. Teixeira, J. A., Vicente, A. A. & Belo, I. in *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações* (Fonseca, M. M. & Teixeira, J. A.) 103–124 (2007).
80. Menge, M., Mukherjee, J. & Scheper, T. Application of oxygen vectors to *Claviceps purpurea* cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 411–416 (2001).
81. Doran, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. 1st Edition. San Diego.(Academic Press, 1995).
82. Nielsen, J., Villadsen, J. & Lidén, G. in *Bioreaction Engineering Principles* 423–474 (Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2003).
83. Galaction, A.-I., Cascaval, D., Oniscu, C. & Turnea, M. Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. 1. Simulated fermentation broths. *Bioprocess and biosystems engineering* **26**, 231–8 (2004).
84. Ho, C. S., Ju, L. K. & Baddour, R. F. Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of n-hexadecane. *Biotechnology and bioengineering* **36**, 1110–8 (1990).
85. Puthli, M. S., Rathod, V. K. & Pandit, A. B. Gas–liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* **23**, 25–30 (2005).
-

-
86. MacLean, G. T. Oxygen transfer in aerated systems with two liquid phases. *Process Biochemistry* **12**, 22–24 (1977).
87. Galaction, A.-I., Cascaval, D., Turnea, M. & Folescu, E. Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors 2. *Propionibacterium shermanii* broths. *Bioprocess and biosystems engineering* **27**, 263–71 (2005).
88. Lai, Z.-W., Rahim, R. A., Ariff, A. B. & Mohamad, R. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. *Journal of bioscience and bioengineering* **114**, 286–91 (2012).
89. Clarke, K. G. & Correia, L. D. C. Oxygen transfer in hydrocarbon–aqueous dispersions and its applicability to alkane bioprocesses: A review. *Biochemical Engineering Journal* **39**, 405–429 (2008).
90. Zhang, J. G., Wang, X. D., Zhang, J. N. & Wei, D. Z. Oxygen vectors used for S-adenosylmethionine production in recombinant *Pichia pastoris* with sorbitol as supplemental carbon source. *Journal of bioscience and bioengineering* **105**, 335–40 (2008).
91. Lai, L.-S. T., Tsai, T.-H. & Wang, T. C. Application of oxygen vectors to *Aspergillus terreus* cultivation. *Journal of bioscience and bioengineering* **94**, 453–9 (2002).
92. Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M. & Sun, J. Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess and biosystems engineering* **32**, 755–63 (2009).
93. Dumont, E. & Delmas, H. Mass transfer enhancement of gas absorption in oil-in-water systems: a review. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **42**, 419–438 (2003).
94. Chin, K., Khattak, S. F., Bhatia, S. R. & Roberts, S. C. Hydrogel-perfluorocarbon composite scaffold promotes oxygen transport to immobilized cells. *Biotechnology progress* **24**, 358–66 (2008).
95. Leung, R., Poncelet, D. & Neufeld, R. J. Enhancement of Oxygen Transfer Rate Using Microencapsulated Silicone Oils as Oxygen Carriers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **68**, 37–46 (1997).
96. Atlas, R. *Handbook of Microbiological Media*. 4th Edition. Washington, D.C.. (CRC Press, 2010).
97. Teresa, A. M. Leveduras oleaginosas para a produção de biodiesel, a partir de resíduos agroindustriais. Otimização das condições de crescimento e de produção lipídica. 89 (2012).
98. Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. & Hu, Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of microbiological methods* **77**, 41–7 (2009).
99. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426–428 (1959).
100. Weatherburn, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* **39**, 971–974 (1967).
101. Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**, 497–509 (1957).
102. Hein, M. & Isengard, H.-D. Determination of underivatized fatty acids by HPLC. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **204**, 420–424 (1997).
-

103. Kimura, K., Yamaoka, M. & Kamisaka, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of microbiological methods* **56**, 331–8 (2004).
104. Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A. & Magnani, M. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of microbiological methods* **87**, 17–23 (2011).
105. Raposo, S. & Lima-Costa, M. E. Effects of the hydrodynamic environment and oxygen mass transfer on plant cell growth and milk-clotting protease production in a stirred-tank reactor. *Engineering in Life Sciences* **12**, 441–449 (2012).
106. Maia, C. Produção de um agente de controlo biológico recorrendo a subprodutos da indústria agro-alimentar. (2011).
107. Brown, D. E., Hasan, M., Lepe-Casillas, M. & Thornton, a. J. Effect of temperature and pH on lipid accumulation by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **34**, 335–339 (1990).
108. Turcotte, G. & Kosaric, N. The effect of C/N ratio on lipid production by *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788. *Biotechnology Letters* **11**, 637–642 (1989).
109. Abreu, F. R., Lima, D. G., Hamú, E. H., Wolf, C. & Suarez, P. A. Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **209**, 29–33 (2004).
110. Demirbaş, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy Conversion and Management* **44**, 2093–2109 (2003).

ANEXOS

Anexo I. Preparação da infusão de Batata

Tal como foi referido no ponto 2.1.3 a preparação da infusão de batata, foi efetuada através da adição 200 g de batata cortada às fatias em 1 L de água destilada, aqueceu-se lentamente até ferver, ferveu durante 30 minutos, em seguida filtrou-se a infusão.

Anexo II. Preparação do tampão fosfato salino (PBS)

Conforme referido no ponto 2.4.5 a solução de PBS foi obtida através da junção de duas soluções, tampão fosfato e tampão fosfato de potássio a 10 mM com 0,15M de Cloreto de potássio.

Tampão fosfato a 0,1 M e pH 7:

Adicionar 10,71 g/L de fosfato de dipotássio (K_2HPO_4) e 5,24 g/L de hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) em 1 L de água destilada.

Preparação da solução PBS (tampão fosfato de potássio a 10 mM com 0,15 M de Cloreto de potássio (KCl):

Para 1 L de solução, adicionar 11,18 g de KCl e 100 mL da solução de tampão fosfato a 0,1 M em 1 L de água destilada.

Anexo III. Método de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico)

O reagente DNS foi preparado com base em duas soluções:

Solução I: adicionar a quente 5g de ácido 3,5-dinitrossalicílico a 100 mL de solução de hidróxido de sódio.

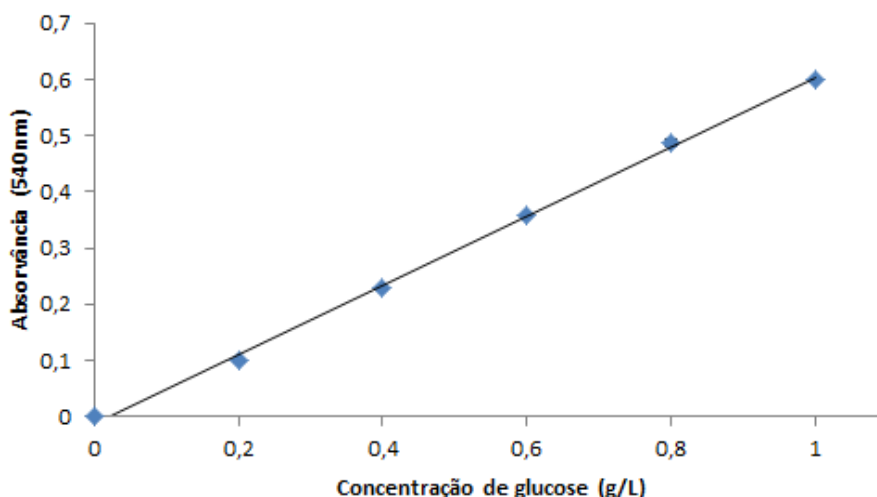
Solução II: Consiste numa solução de tartarato duplo de sódio e potássio (660 g/L).

Adicionar a quente 250 mL da solução II e perfazer o volume de 500 mL.

Procedimento: Adicionar 1 mL de reagente DNS a 1 mL de amostra (diluída de acordo com a necessidade de encontro na curva padrão) em tubos de ensaio. Esta mistura é fervida num banho a 100°C durante 5 minutos, onde ocorrerá, na presença de açúcares redutores, a redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, com formação de um complexo acastanhado. Arrefecer à temperatura ambiente e adicionar 10 mL de água destilada. As leituras no espectrofotómetro são realizadas a 540 nm, após agitação imediata das amostras.

Anexo IV. Curva de calibração dos açúcares redutores

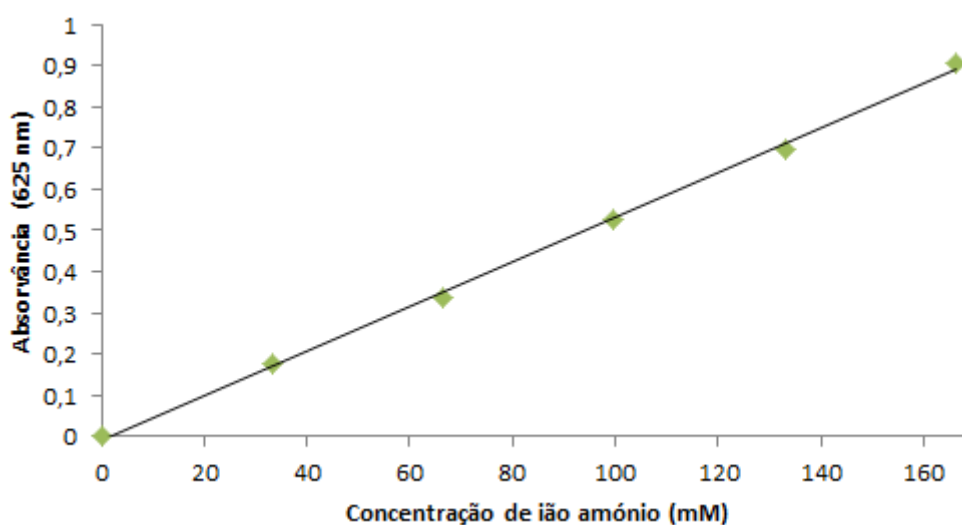
Conforme referido no ponto 2.4.3 a quantificação dos açúcares redutores foi efetuada através da curva de calibração obtida para o açúcar em estudo. A gama de concentrações de glucose encontra-se entre 0 e 1 g/L e as amostras foram efetuadas em triplicado. Na figura seguinte apresenta-se a curva de calibração para a glucose.



Curva padrão de DNS. Absorvância a 540 nm para soluções de glucose com diferentes concentrações. Regressão linear obtida: $Y=0,6124X-0,0111$; $R^2=0,999$. Apresentados valores médios \pm desvio padrão.

Anexo V. Curva de calibração do azoto

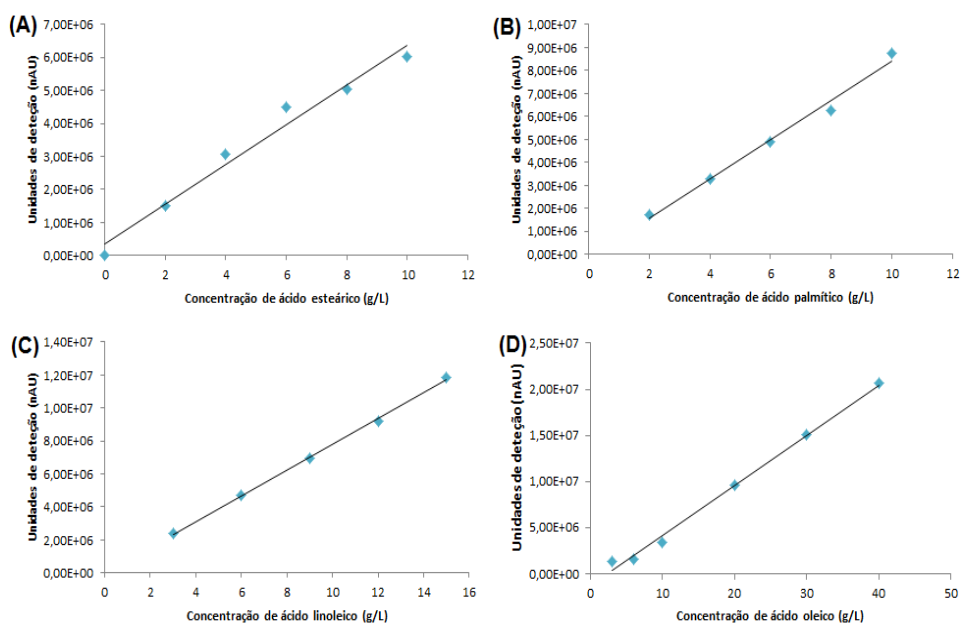
Como referido anteriormente no ponto 2.4.4 a quantificação do azoto presente no meio de cultura foi efetuada através de uma curva de calibração pelo método do fenol-hipoclorito, usando concentrações diferentes de sulfato de amónia, entre 0 e 1,5 g/L. As amostras foram efetuadas em triplicado, na figura seguinte está representada a curva de calibração obtida.



Curva padrão da reação de fenol-hipoclorito. Absorvância a 625 nm para soluções de sulfato de amónia com diferentes concentrações. Reta de regressão linear obtida: $Y=0,0054X-0,0082$; $R^2=0,999$. Apresentados valores médios \pm desvio padrão.

Anexo VI. Curvas de calibração dos ácidos gordos

Para calcular o conteúdo em ácidos gordos (% p/p) presentes em cada amostra, após extração, foi necessário obter curvas de calibração, para isso utilizaram-se quatro padrões: ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico e ácido esteárico, diluídos em clorofórmio. Para cada um dos ácidos gordos foi determinada uma curva padrão, usando concentrações conhecidas de cada ácido. Na figura seguinte estão representadas as curvas padrão obtidas.



Curvas padrões para cada ácido gordo, para análise em HPLC, com diferentes concentrações. **(A)** ácido esteárico, reta de regressão linear obtida: $Y=600989X+349838$; $R^2=0,975$, **(B)** ácido palmítico, reta de regressão linear obtida: $Y=853174X-153135$; $R^2=0,989$, **(C)** ácido linoleico, reta de regressão linear obtida: $Y=776771X+246383$; $R^2=0,999$ e **(D)** ácido oleico, reta de regressão linear obtida: $Y=541314X-100000$; $R^2=0,995$.